

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



## **TESIS DOCTORAL**

**Metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S de resistencia a aminoglucósidos:  
Mecanismo de acción, coste biológico e interferencia con metilaciones**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Belén Gutiérrez Soriano**

Director

Bruno González Zorn

**Madrid, 2014**

Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

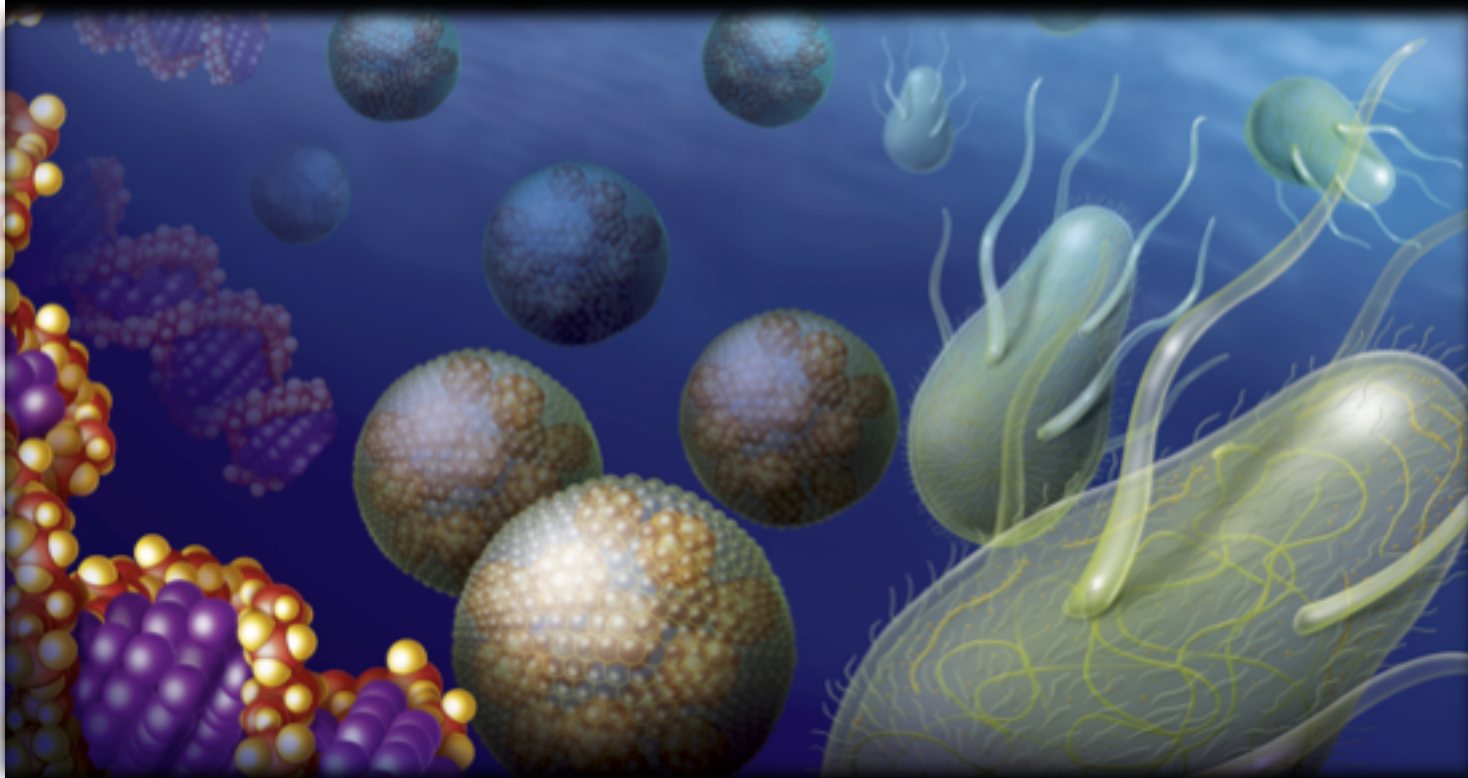
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



# **Metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S de resistencia a aminoglucósidos:**

Mecanismo de acción, coste biológico e  
interferencia con metilaciones intrínsecas



Belén Gutiérrez Soriano

Madrid, 2014



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Sanidad Animal**



**Metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S**

**de resistencia a aminoglucósidos:**

**Mecanismo de acción, coste biológico e interferencia con  
metilaciones intrínsecas**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

**Belén Gutiérrez Soriano**

**Bajo la dirección del Profesor**

**Bruno González Zorn**

**Madrid, 2014**

**Portada:** Ilustración que representa el origen de los procariotas. En la imagen aparecen de izquierda a derecha: moléculas de ARN, moléculas lipídicas necesarias para crear una envuelta y finalmente el surgimiento de las células procariotas. Imagen de Age Fotostock, código BSI-1202305. Autor, JACOPIN.

**Contraportada:** Ribosoma bacteriano. Modelo tridimensional de la subunidad 30S del ribosoma de *Escherichia coli*. Imagen de Fineart America, #50174. Artist, Laguna Design.



Bruno González Zorn, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM),

**CERTIFICO:**

Que la tesis doctoral titulada “Metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S de resistencia a aminoglucósidos: mecanismo de acción, coste biológico e interferencia con metilaciones intrínsecas” que presenta Dña. Belén Gutiérrez Soriano, Licenciada en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo mi dirección y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Por ello, cumpliendo la normativa vigente, informo favorablemente para que proceda a su defensa, en Madrid a seis de mayo de 2014.

Fdo. Bruno González Zorn





# Índice



Imagen: El alquimista, pintura de David Teniers, *ca.* 1631-1640. Pertenece a la colección del Museo Nacional Del Prado, Madrid.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	7
Índice de figuras .....	11
Índice de tablas.....	13
Abreviaturas, siglas, símbolos y términos latinos y anglosajones .....	14
 RESUMEN .....	19
 SUMMARY .....	27
 INTRODUCCIÓN .....	35
 CAPÍTULO I. EL RIBOSOMA BACTERIANO COMO DIANA PARA ANTIBIÓTICOS.....	35
1.1. La enzima más antigua.....	35
1.2. Resolución de su estructura .....	37
1.3. Regiones funcionales del ribosoma y la síntesis de proteínas .....	38
1.4. Sitios de unión de los antibióticos en el ribosoma.....	41
1.4.1. Dianas de acción de antibióticos en la subunidad 30S.....	44
1.4.2. Dianas de acción de antibióticos en la subunidad 50S.....	45
1.5. Modificaciones endógenas post-transcripcionales en el ARN ribosómico .....	47
1.5.1. Metilaciones .....	48
1.5.2. Pseudouridilaciones.....	48
 CAPÍTULO II. AMINOGLUCÓSIDOS .....	51
2.1. Definición de antibiótico .....	51
2.2. Origen y función de los antibióticos.....	51
2.3. Selman Waksman y los aminoglucósidos .....	53
2.4. Estructura química y clasificación de los aminoglucósidos.....	55
2.5. Propiedades y vías de administración.....	58
2.6. Mecanismo de acción.....	59
2.6.1. Diana en la hélice 44 del sitio-A del ARNr 16S .....	60
2.6.2. Diana en la hélice 69 del ARNr 23S .....	63

2.6.3. Especificidad de unión en el ribosoma procariota .....	65
<b>2.7. Uso clínico.....</b>	<b>66</b>
2.7.1. Medicina humana: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y fibrosis quística. ....	68
2.7.2. Medicina veterinaria y vegetal.....	70
<b>2.8. Toxicidad de los aminoglucósidos y la mitocondria eucariota .....</b>	<b>71</b>
2.8.1. Ototoxicidad .....	72
2.8.2. Nefrotoxicidad.....	73
<b>2.9. Modificaciones post-transcripcionales en las dianas de los aminoglucósidos ....</b>	<b>74</b>
2.9.1. Modificaciones endógenas post-transcripcionales en la H44 y región adyacente del ARNr 16S de <i>Escherichia coli</i> .....	76
2.9.2. Modificaciones endógenas post-transcripcionales en la H69 y región adyacente del ARNr 23S de <i>Escherichia coli</i> .....	78
2.9.3. Modificaciones que confieren resistencia a aminoglucósidos .....	79

### **CAPÍTULO III. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS AMINOGLUCÓSIDOS: LAS METILASAS DEL ARNr DEL 16S .....**

<b>3.1. La resistencia a antibióticos.....</b>	<b>80</b>
<b>3.2. Resistencia a los aminoglucósidos .....</b>	<b>81</b>
3.2.1. Modificación de la concentración intracelular .....	81
3.2.1.1. Reducción en la entrada .....	81
3.2.1.2. Bombas de eflujo .....	82
3.2.1.3. Proteasas de membrana .....	83
3.2.2. Modificación enzimática de los aminoglucósidos .....	84
3.2.2.1. Nomenclatura .....	84
3.2.2.2. Aminoglucósido N-acetiltransferasas (AACs) .....	85
3.2.2.3. Aminoglucósido O-nucleotidiltransferasas (ANTs).....	85
3.2.2.4. Aminoglucósido O-fosfotransferasas (APHs).....	85
3.2.3. Modificación de la diana .....	86
3.2.3.1. Mutación de la diana .....	86
3.2.3.2. Metilaciones post-transcripcionales del ARNr 16S .....	87
<b>3.3. Metiltransferasas del ARNr 16S que confieren altos niveles de resistencia a aminoglucósidos .....</b>	<b>88</b>
3.3.1. Metiltransferasas intrínsecas en bacterias productoras de aminoglucósidos .....	88
3.3.1.1. Clasificación en familias Kgm y Kam .....	88
3.3.2. Metiltransferasas adquiridas en bacterias patógenas.....	89
3.3.2.1. Clasificación en familias Arm y Pam.....	89
3.3.2.2. Función enzimática.....	90
3.3.2.3. Estructura de las metiltransferasas .....	92
3.3.2.4. RmtB (m <sup>7</sup> G1405 adquirida) versus Sgm (m <sup>7</sup> G1405 intrínseca) .....	94

3.3.2.5. Análisis de MTasas m <sup>7</sup> G para el diseño de inhibidores específicos de las MTasas de m <sup>7</sup> G1405 .....	95
3.3.3. Epidemiología molecular de las metiltransferasas adquiridas .....	97
3.3.3.1. Orden cronológico de identificación .....	97
3.3.3.2. Distribución mundial .....	99
3.3.3.3. Otros determinantes de resistencia emergentes que coexisten con las metilasas adquiridas .....	101
3.3.3.3.1. Coexistencia con determinantes de resistencia a β-lactámicos .....	101
3.3.3.3.2. Coexistencia con determinantes de resistencia a quinolonas .....	102
<b>OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>OBJECTIVES AND JUSTIFICATION.....</b>	<b>109</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>113</b>
<i>I. Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases .....</i>	<i>115</i>
<i>II. Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of Pseudomonas aeruginosa rRNAs .....</i>	<i>125</i>
<i>III. Novel genetic environment of qnrB2 associated with TEM-1 and SHV-12 on pB1004, an IncHI2 plasmid, in Salmonella Bredeney BB1047 from Spain .....</i>	<i>139</i>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>147</b>
<b>1. Caracterización del mecanismo de acción de las metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S que confieren resistencia a aminoglucósidos. ....</b>	<b>147</b>
<b>2. Modificaciones post-transcripcionales endógenas en el sitio de unión de los aminoglucósidos en el ribosoma de P. aeruginosa.....</b>	<b>151</b>
2.1. Modificaciones en la diana primaria del ARNr 16S .....	152
2.2. Modificaciones en la diana secundaria del ARNr 23S.....	153

2.3. Ausencia en <i>P. aeruginosa</i> del homólogo de RsmF que modifica la posición $m^5C1407$ en el ARNr 16S de <i>E. coli</i> .....	154
<b>3. Interferencia entre metilasas intrínsecas del ribosoma y metilasas de resistencia adquiridas .....</b>	<b>155</b>
<b>4. Coste biológico de la adquisición de una metilasa que confiere resistencia a aminoglucósidos .....</b>	<b>156</b>
<b>5. Papel de la metilasa endógena RsmF en la susceptibilidad intrínseca a los aminoglucósidos en <i>E. coli</i>.....</b>	<b>160</b>
<b>6. Origen de las metiltransferasas adquiridas .....</b>	<b>160</b>
<b>7. QnrB2 y su entorno genético.....</b>	<b>163</b>
<b>8. Importancia de este trabajo y perspectivas .....</b>	<b>165</b>
8.1. Implicaciones de las interacciones entre metilasas adquiridas y endógenas en la selección y evolución hacia un ribosoma bacteriano resistente a aminoglucósidos .....	166
8.2. Estudio de la arquitectura del sitio de unión de los aminoglucósidos en <i>P.aeruginosa</i> para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas .....	167
8.3. Descubrimiento de nuevos antibióticos, recuperación de viejos aminoglucósidos y/o restauración de la sensibilidad frente a los mismos.....	168
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>173</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>177</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>181</b>



## Índice de figuras

## INTRODUCCIÓN

• <b>Figura 1.</b> Síntesis de proteínas en el ribosoma.....	36
• <b>Figura 2.</b> Reconocimiento de las interacciones codón-anticodón por el ribosoma.....	39
• <b>Figura 3.</b> Reciclaje del ribosoma.....	41
• <b>Figura 4.</b> Sitios de unión de antibióticos en el ribosoma bacteriano.....	43
• <b>Figura 5.</b> Reacciones de pseudouridilación (A) y metilación en la base y en la ribosa (B).....	49
• <b>Figura 6.</b> Estructura química de los aminoglucósidos que incorporan un anillo 2-desoxiestreptamino (2-DOS).....	56
• <b>Figura 7.</b> Estructura química de la estreptomicina.....	57
• <b>Figura 8.</b> Diana de unión de los aminoglucósidos en la H44 del ARNr 16S.....	60
• <b>Figura 9.</b> Disrupción de los aminoglucósidos en distintos pasos de la elongación.....	63
• <b>Figura 10.</b> Interacción de los aminoglucósidos con el ARNr 16S y 23S.....	64
• <b>Figura 11.</b> Estructura secundaria de la H44 en la región decodificante del ARNr 16S de procariotas ( <i>E. coli</i> ) y eucariotas ( <i>T. thermophila</i> y <i>H. sapiens</i> ).....	65
• <b>Figura 12.</b> Estructura secundaria de la H69 en el ARNr 23S de bacterias ( <i>E. coli</i> ) y eucariotas ( <i>H. sapiens</i> ).....	66
• <b>Figura 13.</b> Representación esquemática de la progresión de una infección de <i>P. aeruginosa</i> en un paciente hipotético con fibrosis quística.....	70
• <b>Figura 14.</b> Estructura secundaria del sitio-A de unión a los aminoglucósidos en el ARNr 16S de <i>E. coli</i> y su región correspondiente en el ARNr 12S mitocondrial humano.....	73
• <b>Figura 15.</b> Modificaciones post-transcripcionales del ARNr en el sitio de acción de los aminoglucósidos en <i>E. coli</i> .....	75
• <b>Figura 16.</b> Ilustración esquemática de los cambios conformacionales del ARNr de la subunidad 30S controlados por KsgA.....	77
• <b>Figura 17.</b> Campañas para el uso responsable de antibióticos de la Unión Europea y del Ministerio Español de Sanidad y Consumo de España.....	81
• <b>Figura 18.</b> Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos.....	82
• <b>Figura 19.</b> Molécula de kanamicina B con las diferentes enzimas modificadoras que actúan sobre ella.....	86
• <b>Figura 20.</b> Dendrograma de las metilasas del ARNr 16S que confieren resistencia a aminoglucósidos.....	91
• <b>Figura 21.</b> Estructura tridimensional de las interacciones de diferentes aminoglucósidos con los nucleótidos G1405 y A1408 en el ARNr 16S.....	93
• <b>Figura 22.</b> Estructura de RmtB unida a AdoHcy.....	94
• <b>Figura 23.</b> Alineamiento de secuencias homólogas a RmtB con metilasas adquiridas e intrínsecas que metilan en G1405 del ARNr 16S.....	96
• <b>Figura 24.</b> Mapa global de la distribución de las metilasas adquiridas.....	100

## PUBLICACIONES

**Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases.**

• <b>Figure 1.</b> Three-dimensional structure of the <i>E. coli</i> 30S subunit, representation of the <i>E. coli</i> 16S rRNA secondary structure showing the sequence in helix 44 and aminoglycoside interactions at the ribosomal A-site on 16S rRNA.....	119
• <b>Figure 2.</b> MALDI MS spectra of RNase T1 oligonucleotides from the <i>E. coli</i> 16S rRNA sequence C1378 to G1432.....	120

• <b>Figure 3.</b> Fitness cost of RsmF and RmtC in different backgrounds.....	122
--	-----

**Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs.**

• <b>Figura 1.</b> Aminoglycoside binding-sites (red) within the rRNAs of <i>P. aeruginosa</i> .....	128
• <b>Figura 2.</b> MALDI-MS analyses of the aminoglycoside sites within <i>P. aeruginosa</i> rRNAs.....	130
• <b>Figure 3.</b> Gel autoradiograms of primer extension on <i>P. aeruginosa</i> rRNAs.....	131
• <b>Figure 4.</b> MALDI-MS spectra of RNase T1 fragments from the 16S rRNA sequence C1378-G1432 derived from aminoglycoside-susceptible and -resistant <i>P. aeruginosa</i> strains.....	132
• <b>Figure S1.</b> Comparative dendrograms based on bacterial 16S rRNA and <i>rsmF</i> sequences.....	136
• <b>Figure S2.</b> Catalysis of the 16S rRNA m <sup>7</sup> G1405 modification by RmtD.....	137

**Novel genetic environment of *qnrB2* associated with TEM-1 and SHV-12 on pB1004, an IncHI2 plasmid, in *Salmonella* Bredeney BB1047 from Spain.**

• <b>Figure 1.</b> Schematic representation of the genetic environments of the <i>qnrB2</i> gene described to date. ....	142
--	-----

**DISCUSIÓN**

• <b>Figura 25.</b> Fragmentos de ARNr 16S obtenidos para el análisis mediante espectrometría de masas MALDI.....	149
• <b>Figura 26.</b> Regiones de unión a los aminoglucósidos en el ARNr de <i>P. aeruginosa</i> y sus respectivas modificaciones post-transcripcionales intrínsecas y adquiridas.....	152
• <b>Figura 27.</b> Cepa de <i>E. coli</i> BW25113, portadora de <i>rsmF</i> de manera intrínseca, y mutantes realizados a partir de la misma.....	157
• <b>Figura 28.</b> Selección exitosa de las metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S y tratamientos alternativos para evitar dicha selección y posterior diseminación.....	159
• <b>Figura 29.</b> Dendrograma de las metiltransferasas del ARNr 16S de las familias Arm (adquiridas) y Kgm (intrínsecas) que metilan en m <sup>7</sup> G1405.....	163
• <b>Figura 30.</b> Representación esquemática del entorno genético de <i>qnrB2</i> en pB1004 y su región homóloga en los plásmidos pEC-IMP y pEC-IMPQ.....	165

## Índice de tablas

### INTRODUCCIÓN

- **Tabla 1.** Componentes ribosomales de los diferentes dominios de la vida y de la mitocondria.....36
- **Tabla 2.** Nucleótidos modificados del ARNr en *Escherichia coli* y sus respectivas enzimas modificadoras.....50
- **Tabla 3.** Clasificación de los aminoglucósidos.....58
- **Tabla 4.** Espectro de acción de los aminoglucósidos.....67
- **Tabla 5.** Residuos clave implicados en la unión al AdoMet (muy conservados entre metiltransferasas m<sup>7</sup>G) y a la guanosina (específicos).....97

### PUBLICACIONES

#### **Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases.**

- **Table 1.** Aminoglycoside susceptibilities of *E. coli* with and without *rsmF* and/or *rmtC*.....123

#### **Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs.**

- **Table 1.** Modified nucleotides within the aminoglycoside binding sites.....129
- **Table 2.** Susceptibilities to aminoglycosides of the *P. aeruginosa* strains PAO1 and BB1285 *rmtD*<sup>+</sup> .....133

#### **Novel genetic environment of *qnrB2* associated with TEM-1 and SHV-12 on pB1004, an IncHI2 plasmid, in *Salmonella* Bredeney BB1047 from Spain.**

- **Table S1.** MICs of various antibiotics for *Samonella* Bredeney and *E. coli* with and without *qnrB2*. .....144

### DISCUSIÓN

- **Tabla 6.** Metilasas del ARNr 16S adquiridas e intrínsecas que confieren altos niveles de resistencia a aminoglucósidos.....162

## Abreviaturas, siglas, símbolos y términos latinos y anglosajones

- CH<sub>3</sub>** Grupo metilo
- 2-DOS** 2-desoxiestreptaminos
- Å** Ångström, distancia molecular
- AAC** Acetiltransferasas
- ADN** Ácido desoxiribonucleico
- Ado-Hcy** S-adenosil L-homocisteína
- Ado-Met o SAM** S-adenosilmetionina
- ANT** Nucleotidiltransferasas
- AMP** Adenosín monofosfato
- APH** Fosfotransferasas
- Arm** *Aminoglycoside resistance methyltransferase*
- ARN** Ácido ribonucleico
- ARNm** ARN mensajero
- ARNnp** ARN nuclear pequeño
- ARNr** ARN ribosómico
- ARNt** ARN transferente
- ARNtm** ARN transferente-mensajero
- ATP** Adenosín trifosfato
- ca.** Del latín *circa*, ‘alrededor’
- C-terminal** Carboxilo terminal
- CLSI** *Clinical and Laboratory Standard Institute*
- CMI** Concentración Mínima Inhibitoria
- CPT** Centro Peptidil Transferasa
- Da** Dalton, unidad de masa atómica
- EF-G** Factor de elongación G
- EF-Tu** Factor de elongación Tu
- ESBLs** β-lactamasas de espectro extendido
- et al.** Del latín *et alii*, ‘y otros’
- G+C** Contenido en Guanina + Citosina (porcentaje)
- GTP** Guanosín trifosfato
- H** Hélice (acompañada de un número)
- IF-2** Factor de iniciación 2
- In vitro** Del latín, ‘en vidrio’; empleado para referirse a un experimento realizado en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.
- Kam** *kanamycin-apramycin methyltransferase*
- Kgm** *kanamycin-gentamicin methyltransferase*
- L** Proteína ribosómica de la subunidad grande (precedida de un número)
- m/z** *mass-to-charge-ratio*

**m<sup>4</sup>Cm1402** m delante del nucleótido indica la presencia de un grupo metilo en la base y el superíndice indica la posición del grupo metilo en dicha base; m detrás del nucleótido indica que el grupo metilo se encuentra localizado en el azúcar.

**MALDI MS** *Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*

**MFS** *Major Facilitator Superfamily*

**mg/L** Miligramos/litro

**MLS<sub>B</sub>** Macrólidos, Lincosamidas, Estreptogramina B

**MTasa** Metiltransferasa

**N-terminal** Amino terminal

**ORFs** *Open Reading Frames*

**Pam** *Panaminoglycoside resistance methyltransferase*

**pH** Potencial de hidrógeno

**pK<sub>a</sub>** Potencial de disociación de un ácido

**proteínas-r** Proteínas ribosomales

**RF** Factor de liberación

**RFM** *Rossmann Fold Methyltransferase*

**RND** *Resistant Nodular Division*

**S** Svedberg, 1: Coeficiente de sedimentación (cuando va precedida de un número); 2: Proteína ribosomal de la subunidad pequeña (cuando precede a un número)

**Sitio-A** Sitio aminoacil

**Sitio-E** Sitio de salida

**Sitio-P** Sitio peptidil

**versus** Del latín, ‘ir hacia’ aunque empleada por los ingleses para expresar confrontación ‘contra’

**wt** *Wild type*

**Ψ** Pseudouridina







# Resumen

Imagen: Laboratorio de Louis Pasteur en la Escuela Normal Superior de París, *ca.*1885. La imagen pertenece al 'Hulton Archive'. Fotógrafo, Three Lions.

## RESUMEN

El descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming supuso el inicio de una nueva era en la medicina. Gracias a los antibióticos, multitud de enfermedades bacterianas que eran, inevitablemente, causa de muerte se convirtieron en curables. No obstante, sin ser conscientes de sus consecuencias, durante muchos años los antibióticos se han empleado de forma masiva tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. Paralelamente, las bacterias han demostrado una enorme capacidad para evolucionar y adaptarse a los mismos, dando lugar a la disminución de su eficacia debido al desarrollo de mecanismos de resistencia frente a todos los antibióticos disponibles para uso clínico. Además, gracias a los mecanismos de adquisición y transferencia de genes de las bacterias, la emergencia y diseminación de dichos mecanismos de resistencia en bacterias patógenas ha sido estrepitosa. Todo ello, sumado a la escasez en el descubrimiento y síntesis de nuevos antibióticos en los últimos años, ha dado lugar a que la resistencia a los antimicrobianos se haya convertido en uno de los retos más importantes en la medicina actual; acercándonos peligrosamente a la era post-antibiótica.

El ribosoma es la enzima más grande y compleja que existe. Además, se trata de la enzima más antigua en la naturaleza cuya función esencial, la síntesis de proteínas, es la misma en todas las células vivas. La conservación de su función ha ido asociada a la conservación global de su estructura. Esto quiere decir que aunque la última vez que procariotas y eucariotas compartieron un ancestro común fue aproximadamente hace 3500 millones de años, las sustituciones que se han ido originando, tanto en el ARNr como en las proteínas ribosomales de sus respectivos ribosomas, han mantenido globalmente su forma y ensamblaje. De esta manera, el ribosoma va a estar formado por una serie de componentes dependientes entre sí y cuya correcta maduración permite un ensamblaje específico de los mismos; consiguiendo en definitiva llevar a cabo su función de síntesis de proteínas de manera eficaz.

A su vez, el ribosoma bacteriano es diana de múltiples antibióticos que interaccionan con componentes cruciales del mismo interfiriendo así en la síntesis de proteínas. A pesar de la gran variedad de moléculas, que tienen como diana el ribosoma, éstas van a unirse a regiones ribosomales muy concretas que a menudo se

solapan entre ellas. La superficie de las dianas de los antibióticos, tanto en la subunidad pequeña como en la subunidad grande del ribosoma, va a consistir principalmente en regiones del ARNr y no tanto en componentes proteicos ribosomales. Esto no es de extrañar debido al importante papel que juega el ARNr en el funcionamiento del ribosoma. Entre las etapas de maduración del ribosoma, caben destacar las múltiples modificaciones post-transcripcionales que se llevan a cabo en el ARNr y que confieren al ribosoma su conformación final. Estas modificaciones intrínsecas consisten principalmente en metilaciones o pseudouridilaciones, que van a estar localizadas en regiones del ARNr con funciones esenciales, que en ocasiones también son diana de antibióticos. En *Escherichia coli* los ARNrs que forman las diferentes subunidades, han sido completamente mapeados y constan de 11 nucleótidos modificados en el ARNr 16S y 25 en el ARNr 23S. Muchas de estas modificaciones se conservan entre los diferentes microorganismos mientras que otras son específicas de ciertos grupos de bacterias o arqueas. La adición post-transcripcional de estas modificaciones se lleva a cabo mediante enzimas, codificadas en el cromosoma, que actúan de manera sincronizada. La agrupación de dichas metilaciones implica que exista un orden evolutivo de metilación, para evitar tanto que las metilasas se obstaculicen entre sí como posibles efectos obstructivos estereoeléctricos inducidos por las propias metilaciones.

Los aminoglucósidos son antibióticos que tienen como diana el ribosoma bacteriano y por tanto interfieren en la síntesis de proteínas. Presentan dos dianas de unión: la hélice 44 del ARNr 16S y la hélice 69 del ARNr 23S. Se trata de antibióticos sintetizados de forma natural por actinomicetos ambientales, principalmente pertenecientes a los géneros *Streptomyces spp.* y *Micromonospora spp.* A su vez, estos microorganismos productores de aminoglucósidos han desarrollado estrategias para protegerse de la acción de los aminoglucósidos que ellos mismos producen. Su estrategia consiste en modificar sus ribosomas mediante una metilación específica en la diana situada en el ARNr 16S confiriéndoles de esta manera altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos.

La metilación del ARNr 16S ha emergido recientemente como mecanismo de resistencia frente a aminoglucósidos en patógenos Gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y microorganismos no fermentativos de la glucosa como



*Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* Su presencia confiere altos niveles de resistencia a todos los aminoglucósidos de uso clínico. Este mecanismo está mediado por metiltransferasas del ARNr 16S que dichos patógenos han adquirido y que comparten cierta similitud con las metiltransferasas presentes de forma intrínseca en los actinomicetos ambientales. La mayoría de estas metilasas adquiridas por patógenos se han localizado formando parte de elementos genéticos móviles como transposones mediados por plásmidos, lo cual incrementa su capacidad de diseminación entre especies también pudiéndose a su vez insertar en el cromosoma. Según su fenotipo de resistencia y grado de similitud con las metilasas intrínsecas caracterizadas previamente en actinomicetos, las metilasas adquiridas se han clasificado en dos familias: Arm (Aminoglycoside Resistance Methyltransferase), que metila G1405, y Pam (Pan-Aminoglucoside resistance Methyltransferase), que metila A1408. Se han identificado en bacterias patógenas nueve genes, *armA*, *rmtA-H* y las variantes *rmtB2* y *rmtD2*, que codifican para metilasas clasificadas dentro de la familia Arm. Tan sólo se ha identificado un gen, *npmA*, cuya enzima correspondiente se encuentra categorizada dentro de la familia Pam. Se ha caracterizado la función enzimática de ArmA, RmtB y RmtC, que van a metilar la posición N7 de G1405 del ARNr 16S, así como de NpmA, que metila la posición N1 de A1408, todas ellas en la subunidad 30S madura.

En este trabajo de tesis doctoral se ha querido profundizar en este mecanismo de resistencia emergente en bacterias patógenas, las metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S, cuya diseminación se ha incrementado a pasos agigantados durante los últimos años.

Para ello, por una parte se ha estudiado su mecanismo de acción, el coste biológico que supone la adquisición de este mecanismo de resistencia y la relación de esta metilación adquirida con el resto de las metilaciones adyacentes presentes de manera intrínseca en el ribosoma bacteriano.

Por otra parte, se han estudiado las modificaciones post-transcripcionales tanto endógenas como adquiridas en las regiones de unión de los aminoglucósidos en el ARNr de *P. aeruginosa*. Los aminoglucósidos son antibióticos de primera elección en el tratamiento de infecciones causadas por este patógeno oportunista. En concreto, la tobramicina es el tratamiento preferente para las infecciones causadas por *P.*

*aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística. El hecho de que dicho patógeno haya adquirido este mecanismo de resistencia dificulta enormemente las posibilidades de tratamiento. Por este motivo, conocer de manera exhaustiva las dianas de dichos antibióticos en el ARNr de este patógeno ha significado un primer paso fundamental con el fin de poner remedio a este grave problema en un futuro a corto-medio plazo.

Por último durante la búsqueda de mecanismos de resistencia emergentes a aminoglucósidos al comienzo de este trabajo de tesis, hemos identificado un aislado de *Salmonella* Bredeney que presentaba un patrón inusual de resistencia a aminoglucósidos que incluía resistencia a fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol y tetraciclinas y por ello hemos caracterizado desde un punto de vista molecular el perfil de resistencia de dicho patógeno.

Los resultados de este trabajo van a agruparse en tres publicaciones:

- En la primera publicación caracterizamos el mecanismo de acción de las metilasas ArmA, RmtB y RmtC, las más prevalentes hasta la fecha, empleando la técnica de espectrometría de masas MALDI. De esta forma hemos observado la metilación estequiométrica de m<sup>7</sup>G1405 en el ARNr 16S que confiere resistencia a los aminoglucósidos, incluso cuando la bacteria crece en un medio libre de antibióticos, y que además dicha metilación adquirida desplaza a la metilación fisiológica m<sup>5</sup>C1407 mediada por RsmF. Se ha querido estudiar la importancia de este desplazamiento así como el coste de la adquisición de una metilasa de resistencia. Mediante ensayos de competición se ha observado que, la pérdida de la metilación endógena en C1407 supone una reducción en el fitness. Sin embargo, la adquisición cromosómica de un gen que codifica para una metiltransferasa de G1405 que confiere resistencia a aminoglucósidos así como la interacción de la misma con la metilación endógena en C1407 no suponen un coste biológico adicional en *E. coli*. Por otro lado, hemos comprobado cómo, en ausencia de la metilación fisiológica en C1407, la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de los aminoglucósidos en *E. coli* aumenta. Esto indica que dicha metilación fisiológica participa en la unión de los aminoglucósidos a su diana. Por tanto, la adquisición de una metilasa de m<sup>7</sup>G1405 confiere resistencia a los aminoglucósidos tanto por la acción directa resultante de dicha metilación como

por la consecuencia indirecta del desplazamiento de la metilación endógena en m<sup>5</sup>C1407.

- En la segunda publicación, mediante espectrometría de masas MALDI y extensión de cebadores, estudiamos las modificaciones post-transcripcionales en las dianas de unión de los aminoglucósidos en el 16S y 23S de *P. aeruginosa*. Cabe destacar que en este caso la metilación fisiológica en C1407 está ausente así como lo está el homólogo de RsmF en el cromosoma de *P. aeruginosa*. Así mismo, hemos caracterizado la metilación mediada por RmtD. En este caso RmtD va a metilar también de manera estequiométrica m<sup>7</sup>G1405 y, además, va a desplazar a una de las metilaciones fisiológicas presentes en C1402. Cabe destacar que este desplazamiento es aún más sorprendente que el observado en el anterior trabajo ya que ambas metilaciones en C1402 están conservadas en todas las especies bacterianas.

El hecho de observar que tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa* la adquisición de una metilasa que confiere resistencia a aminoglucósidos impide una metilación intrínseca, modificando el patrón jerárquico de metilación en el ARNr 16S, es intrigante ya que las modificaciones en el ribosoma tienden a estar altamente conservadas a lo largo del curso de la evolución. Todos los resultados anteriores llevan por tanto a pensar en la selección de bacterias con ribosomas cada vez más resistentes a aminoglucósidos.

- En la tercera publicación, caracterizamos las bases genéticas del perfil de resistencia de una cepa clínica de *Salmonella* Bredeney que ha resultado ser portadora de un plásmido conjugativo de 315 kb perteneciente al grupo de incompatibilidad IncHI2. Este plásmido contiene múltiples genes de resistencia a antibióticos, tales como; el gen que codifica para la enzima modificadora de aminoglucósidos AAC-6-Ib, los genes que codifican para las β-lactamasas TEM-1 y SHV-12 y el gen *qnrB2*, responsable de la resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos y asociado en este caso a un entorno genético nuevo. Dicho entorno posee dos genes homólogos localizados en el cromosoma de la bacteria marina *Marinobacter aquaeolei* VT8, lo cual nos ha sugerido un posible origen marino de este mecanismo de resistencia

emergente. Así mismo porta también un integrón de clase I además de elementos de inserción como *IS21-like*, *IS26* e *ISCR1*, que facilitan el dinamismo de dichos genes de resistencia y su entorno. También cabe destacar que, posteriormente, se ha comprobado que dicho mecanismo de resistencia coexiste con las metilasas adquiridas del ARNr 16S en una misma bacteria.



## *Summary*

Imagen: Mujeres estudiantes en un laboratorio del *Girton College*, fundado en 1869 como el primer *college* residencial para mujeres en Inglaterra, en la universidad de Cambridge. *ca.* 1900. La imagen pertenece al 'Hulton Archive'. Fotógrafo, Reinhold Thiele.

## **SUMMARY**

The discovery of penicillin by Alexander Fleming led to the beginning of a new era in medicine. For the first time a multitude of infectious diseases, that were previously cause of certain death, became curable. However, without being aware of the consequences, antibiotics have been widely used in both human and animal medicine for many years. Concurrently, bacteria have demonstrated an enormous capacity to evolve and adapt to all antibiotics available for clinical use, giving rise to a reduction of their efficacy due to the development of resistance mechanisms. In addition, bacterial acquisition and transfer mechanisms have facilitated a rapid global dissemination of all resistance mechanisms. This taken in combination with the lack of discovery and design of new antimicrobial molecules in the last years have elevated antimicrobial resistance to one of the most significant threats in current medicine potentially leading us to a post antibiotic era.

The ribosome is the largest and most complex enzyme. Additionally, the ribosome is also the most ancient enzyme existing in nature and its essential function is the same in all living cells - that is - protein synthesis. The functional conservation has been associated with the strict conservation of the global structure. This means that, even though the last common ancestor between prokaryotes and eukaryotes was 3500 million years ago; substitutions in both ribosomal RNA (rRNA) and ribosomal proteins (r-proteins) have maintained the global structure and assembly of the ribosome. In this way, the ribosome is assembled by a set of interrelated components, which are perfectly orchestrated to allow for a specific assembly resulting in an efficient protein synthesis machinery.

The bacterial ribosome contains the target sites of numerous antibiotics located in both the large and small subunit, regions consisting primarily of rRNA, and less of ribosomal protein components. This comes as no surprise due to the important role played by rRNA in protein synthesis as compared to ribosomal proteins. Between the intermediate steps of ribosomal maturation, it is important to mention the post-transcriptional modifications that take place in the rRNA before the ribosome reaches its final conformation. These modifications consist of methylations and pseudouridinilations located in rRNA regions with essential functions that are

occasionally targeted by antibiotics. The sites of the housekeeping modifications within *E. coli* rRNAs have been comprehensively mapped and consist of 11 modified nucleotides in the 16S rRNA and 25 in the 23S rRNA. Many of these modifications are conserved between different microorganisms while others are specific to certain groups of Bacteria or Archaea. Chromosomally encoded proteins act in a highly synchronised way to carry out the post-transcriptional incorporation of these modifications. These methylations come with an existing evolutionary hierarchy in order to avoid interference between methyltransferases and the possible obstructive stereoelectronic effects among methylations.

Aminoglycosides are a group of antibiotics that target the bacterial ribosome interfering with protein synthesis. They have two targets: the ribosomal A site of the 16S rRNA helix 44 (H44) and the helix 69 (H69) of the 23S rRNA. Aminoglycosides are synthesized naturally by environmental actinomycetes mainly from the *Streptomyces spp.* and *Micromonospora spp.* genera. Concurrently, these aminoglycoside producers have developed strategies in order to protect themselves from the action of their own aminoglycosides. This is achieved by protecting their ribosomes via a specific methylation of the 16S rRNA target conferring high-level resistance to aminoglycosides.

Methylations of the 16S rRNA have emerged as a mechanism of resistance against aminoglycosides in Gram-negative pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae* family as well as in glucose non-fermentative microorganisms like *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* The presence of this mechanism in these Bacteria confers high-level resistance to all aminoglycosides that are in clinical use. This mechanism is mediated by acquired methyltransferases that share certain similarities with the intrinsic methyltransferases in environmental actinomycetes. Most of these enzymes acquired by pathogens have been found as a part of mobile genetic elements, such as plasmid mediated transposons, facilitating dissemination between species and making it possible for them to be inserted into the chromosome. According to the resistance phenotype conferred by these acquired methylases as well as the similarities with previously characterised intrinsic methylases in actinomycetes, acquired methyltransferases are classified in two families: one methylates residue G1405 and the other methylates residue A1408, Arm and Pam respectively. To date,



nine genes, *armA* and *rmtA-H* and the variants *rmtB2* and *rmtD2* have been described within Arm family (Aminoglycoside Resistance Methyltransferase). Only one gene has been identified, *npmA*, within Pam family (Pan-Aminoglycoside resistance Methyltransferase). The enzymatic function of ArmA, RmtB and RmtC has been characterised, confirming the methylation at the N7-G1405 position of the 16S rRNA. On the other hand NpmA, methylates N1-A1408 position of the 16S rRNA. All of these acquired methyltransferases act on the mature 30S subunit.

In this work we strive to elucidate this rapidly disseminating resistance mechanism as it is emerging in more and more bacterial pathogens globally.

On the one hand we have studied the mechanism of action, biological cost and the relationship between acquired methylations and adjacent intrinsic methylations present in the bacterial ribosome.

Furthermore, we have also studied the post-transcriptional methylations of both endogenous and acquired methylases in the aminoglycoside target-site within the rRNAs of *Pseudomonas aeruginosa*. This microbe was chosen, as aminoglycosides are the first choice antimicrobial for the treatment of infections caused by this pathogen, specifically, tobramycin in patients suffering from cystic fibrosis. The fact that this particular pathogen has acquired a resistance conferring methyltransferase significantly complicates treatment. For this reason, thoroughly elucidating the targets of the antibiotics in the rRNAs of this pathogen is a fundamental step in order to alleviate this concern as soon as possible.

Finally, at the beginning of this doctoral thesis in the process of looking for emerging aminoglycoside resistant mechanisms, we found a clinical isolate of *Samonella* Bredeney with an unusual antimicrobial resistance pattern, which included aminoglycosides,  $\beta$ -lactams, chloramphenicol and tetracyclines. In orther to study the coexistence of different antimicrobial resistance genes, their genetic environment and mechanisms of acquisition, we decided to characterize the genetic molecular basis of that strain.

The main results of this thesis are grouped into three publications:

- In the first publication we characterized the most prevalent acquired methyltransferases, ArmA, RmtB and RmtC by using MALDI mass spectrometry.

With this technique we reported a stoichiometric methylation at residue G1405 in the 16S rRNA, which confers aminoglycoside resistance even in the absence of antibiotic pressure. At the same time methylation of residue G1405 reduces the intrinsic methylation of residue C1407 mediated by RsmF. We wanted to investigate the effects of this impeded methylation as well as the cost of acquiring an aminoglycoside resistance methyltransferase. With fitness assays in *E. coli* we have observed that the loss of the endogenous methylation at C1407, mediated by RsmF, decreases bacterial fitness. On the contrary, acquiring a methylation at G1405 that confers resistance via the integration of RmtC into the chromosome with its native promoter, as well as the subsequently impeded methylation of C1407, do not entail a significant fitness cost for the bacteria. Additionally, we have noticed that in the absence of the housekeeping methylation at C1407, the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) of aminoglycosides in *E. coli* increases. This indicates the involvement of this methylation in aminoglycoside Binding.

- In the second publication we studied post-transcriptional modifications at the aminoglycoside target in the 16S and 23S rRNAs of *P. aeruginosa* via MALDI mass spectrometry and primer extension. It is worth mentioning that this pathogen lacks RsmF as a result of which the methylation at C1407 is absent. Additionally, we characterised the methylation of RmtD, which is also stoichiometric and it too displaces one of the physiological methylations at C1402. It is noteworthy that both methylations at C1402 are conserved in all Bacteria.

In both cases the acquisition of an aminoglycoside resistance methyltransferase impedes a physiological methylation, which modifies the hierarchical pattern of methylation in the 16S rRNA. This is intriguing because the modifications in the ribosome are highly conserved over the course of evolution. All the aforementioned results led us to consider the threats of bacteria developing intrinsically more resistant ribosomes.

- In the third publication, we characterized the genetic basis of a multiresistant *Salmonella* Bredeney clinal strain, which turned out to bear a conjugative IncHI2 plasmid of 315 kb including resistance genes such as; aminoglycoside modifying enzyme AAC-6-Ib,  $\beta$ -lactamases genes encoding for TEM-1 and SHV-12 and the

most significant gene, *qnrB2*, responsible for the fluoroquinolones resistance mechanism, with a novel genetic environment. This environment contains two genes homologous to those located in the chromosome of *Marinobacter aquaeolei* VT8 that suggests a potential marine origin of this emerging resistance mechanism. Furthermore, it bears a class I integron as well as insertion sequence elements such as; IS21-like, IS26 and ISCR1 that facilitate the dynamic nature of the resistance genes and their genetic environment. Finally, is worth mentioning that recently this fluoroquinolone resistance mechanism has been shown to coexist with acquired rRNA methyltransferases in the same strain.





# Introducción

Imagen: Campaña para prevenir la transmisión de la tuberculosis, *ca.* 1941. Mural que formaba parte del *WPA Federal Art Project*, Distrito 4 en Nueva York. Actualmente almacenado en *Library of Congress Prints and Photographs Division* Washington, D.C.

## INTRODUCCIÓN

### CAPÍTULO I. EL RIBOSOMA BACTERIANO COMO DIANA PARA ANTIBIÓTICOS.

#### 1.1. La enzima más antigua.

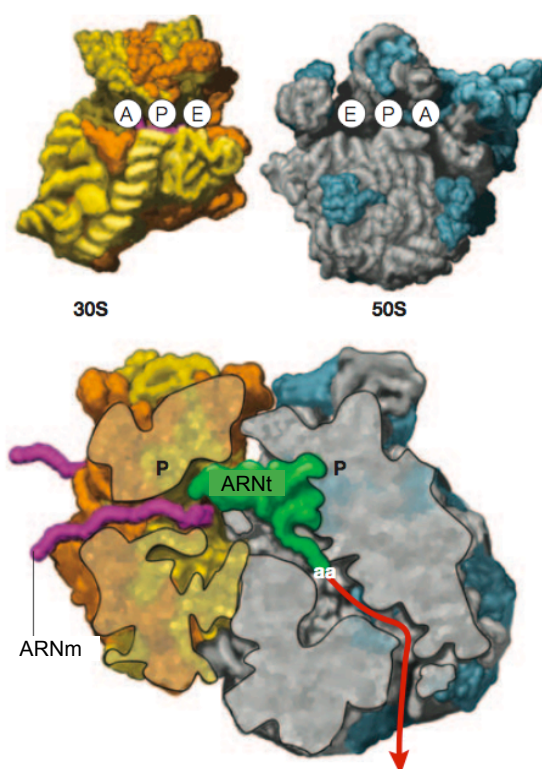
El ribosoma es la enzima más grande y compleja que existe. Está presente incluso en los organismos más simples estando constituida por dos subunidades: una grande y una pequeña, formadas a su vez por diferentes ARNs ribosomales (ARNr) y proteínas (proteínas-r). Así mismo, se trata de la enzima más antigua en la naturaleza llevando a cabo la misma función esencial en todas las células vivas: la síntesis de nuevas proteínas. La conservación de su función ha ido asociada con la conservación global de su estructura. De esta forma, ribosomas de organismos filogenéticamente distintos muestran un grado de similitud importante, tanto entre los ribosomas de los dominios *Bacteria* y *Archaea*, como incluso entre los ribosomas de estos procariotas y los del dominio *Eukarya*. La última vez que procariotas y eucariotas compartieron un ancestro común fue aproximadamente hace 3500 millones de años de manera que durante ese periodo de tiempo se han ido originando sustituciones tanto en las secuencias que componen los ARNr como en las de las proteínas-r (Tabla 1). No obstante, a pesar de estos cambios en las secuencias, los pliegues terciarios de dichos componentes ribosomales así como su ensamblaje se han conservado de manera global a lo largo del curso de la evolución. La conservación de su estructura se ve reflejada en las regiones del ribosoma que están directamente implicadas en la síntesis de proteínas (Figura 1) siendo el ribosoma un sistema complejo formado por componentes dependientes entre sí que necesitan ensamblarse de forma específica para llevar a cabo su función de manera eficaz.<sup>1</sup>

El número de ribosomas por bacteria varía desde 6,700 a 71,000 según la fase y velocidad de crecimiento. El ribosoma bacteriano consiste en tres tipos de ARN (16S, 23S y 5S) y 52 tipos de proteínas. Los ARNrs se procesan a partir de un transcrito primario que en *Escherichia coli* deriva de siete operones *rrn* codificados en el cromosoma.<sup>2</sup>

**Tabla 1. Componentes ribosomales de los diferentes dominios de la vida y de la mitocondria.<sup>1</sup>**

	Bacteria	Archaea	Mitocondria	Eukarya
<b>Subunidad pequeña</b>				
Tamaño	30S	30S	28S	40S
Masa (MDa)	0.8	0.8	1.2	1.4
ARNrs	16S	16S	12S	18S
Número de proteínas-r	20	28	33	32
<b>Subunidad grande</b>				
Tamaño	50S	50S	39S	60S
Masa (MDa)	1.6	1.6	2.4	2.6
ARNrs	23S, 5S	23S, 5S	16S	28S, 5.8S, 5S
Número de proteínas-r	34	40	52	46
<b>Tamaño del ribosoma</b>	70S	70S	55S	80S

Los ribosomas de los cloroplastos (no mostrados en la tabla) se encuentran estructuralmente más cercanos a los del dominio Bacteria. Los ribosomas de la mitocondria han evolucionado de tal manera que el contenido relativo de proteínas-r en relación al contenido en ARNr es superior al del resto de los ribosomas en los diferentes dominios.



**Figura 1. Síntesis de proteínas en el ribosoma.<sup>1</sup>**

En la parte superior aparece la interfaz de las subunidades 30S y 50S de *Thermus thermophilus* mostrando el ARNr en amarillo y gris y las proteínas-r en naranja y azul respectivamente. Los sitios aminoacil (sitio-A), peptidil (sitio-P) y de salida (sitio-E) aparecen también indicados.

La parte inferior de la figura es una sección vertical del ribosoma en el sitio-P con las interfaces de las subunidades 30S y 50S en contacto. La flecha roja representa el crecimiento de la cadena peptídica desde el centro peptidil transferasa, dirigiéndose a través del túnel de salida hasta llegar a la parte posterior de la subunidad 50S.



## 1.2. Resolución de su estructura.

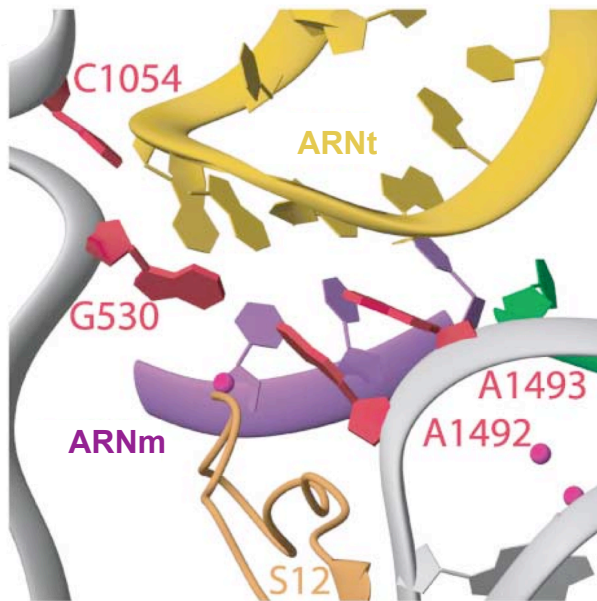
La estructura global del ribosoma se visualizó por primera vez mediante microscopía electrónica en los años 70.<sup>3,4</sup> Posteriormente, esta disciplina fue perfeccionada con técnicas criogénicas<sup>5,6</sup> consiguiendo capturar al ribosoma en diferentes etapas de la traducción.<sup>7,8</sup> Los primeros cristales ribosomales para estudios estructurales se consiguieron hace tres décadas.<sup>9-12</sup> A partir de entonces, siguiendo los avances tecnológicos se han conseguido cristalizar subunidades ribosomales completas de diferentes organismos con una alta resolución: en torno a 2,4-5,5 Å. Para ello, ha sido de gran importancia seleccionar de manera adecuada los organismos a estudiar con el fin de obtener unos cristales viables. Entre ellos se encuentra la bacteria *Thermus thermophilus* (Figura 1), que crece de manera óptima a 70°C, cuya subunidad pequeña fue determinada con una resolución en torno a 3 Å<sup>13,14</sup> y que posteriormente fue completada con una resolución menor, 5,5 Å, pero con la información adicional de las dos subunidades asociadas acomodando al ARN mensajero (ARNm) y ARN transferente (ARNt).<sup>15,16</sup> La mejor resolución hasta ahora, de 2,4 Å, se ha conseguido con la subunidad grande de *Haloarcula marismortui*, una arquea del mar Muerto en Israel adaptada a soluciones salinas saturadas.<sup>17</sup> También se ha resuelto la subunidad grande de la bacteria *Deinococcus radiodurans*, resistente a las radiaciones y por tanto fuente de ribosomas estables.<sup>18</sup> Así mismo la cristalización del ribosoma de *E. coli* también ha sido posible.<sup>19</sup> Más recientemente se ha conseguido la estructura del ribosoma eucariota 80S de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*<sup>20</sup> así como la subunidad 40S y 60S del protozoo *Tetrahymena thermophila*.<sup>21,22</sup>

El modelo ARNr-catalítico sostiene que los ARNr son piezas clave en el funcionamiento del ribosoma mientras que las proteínas-r adoptan un rol de apoyo de estas primeras.<sup>23,24</sup> Este modelo que ya se percibía tras las primeras visualizaciones del ribosoma quedó respaldado con la visualización de la estructura del ribosoma a altas resoluciones. Por tanto, el ARNr es el que dirige principalmente la formación de los puentes peptídicos<sup>25-27</sup> en el cual se encuentra involucrado el nucleótido universalmente conservado A2451.<sup>28-30</sup> A su vez, las proteínas-r van a interactuar con el ARNr permitiendo que éste adopte las conformaciones adecuadas para un funcionamiento eficiente del ribosoma.<sup>31-33</sup>

### 1.3. Regiones funcionales del ribosoma y la síntesis de proteínas.

El ribosoma es la máquina encargada de interpretar, de forma rápida y precisa, el código genético a partir del ARN mensajero para la síntesis de proteínas.<sup>34</sup> La traducción se divide en tres etapas: iniciación, elongación y liberación de la cadena peptídica.

En la traducción, la secuencia de codones en el ARNm dirige la síntesis de la cadena polipeptídica. La secuencia del ARNm se lee en bloques de tres nucleótidos llamados codones. Cada codón se corresponde con uno de los 20 aminoácidos y cada aminoácido es transportado al ribosoma por su propio ARNt. Cada ARNt tiene una secuencia denominada anticodón que encaja de forma específica con su correspondiente codón en el ARNm. Este proceso tiene lugar en el ribosoma siendo el movimiento de los ARNt y del ARNm a través del ribosoma un proceso complicado que combina una alta velocidad con una alta precisión.<sup>34</sup> El ribosoma está constituido por dos subunidades en todas las especies. En bacterias estas dos subunidades se designan como 30S y 50S y juntas dan lugar al ribosoma 70S. Cada subunidad tiene tres sitios de unión para el ARNt; el sitio-A (aminoacil) que acepta un nuevo ARNt aminoacetilado, el sitio-P (peptidil) que sostiene un ARNt que porta la cadena de aminoácidos naciente y el sitio-E (de salida) que sostiene el ARNt desacetilado antes de que abandone el ribosoma. La subunidad 30S se une al ARNm y al ARNt contribuyendo a la fidelidad de la traducción monitorizando el apareamiento de las bases entre los codones del ARNm y los anticodones del ARNt en el proceso de decodificación. La subunidad 50S se une a los brazos aceptores del ARNt y cataliza la formación del enlace peptídico entre el nuevo aminoácido del ARNt en el sitio-A y la cadena peptídica asociada al ARNt en el sitio-P. Las dos subunidades están implicadas en la translocación en donde los ARNt y ARNm se mueven un codón cada vez de manera precisa a través del ribosoma. La traducción a su vez implica la actuación de factores proteicos adicionales, muchos de ellos GTPasas activadas por el ribosoma.



**Figura 2. Reconocimiento de las interacciones codón-anticodón por el ribosoma.**<sup>35</sup> Región decodificante de la subunidad 30S mostrando el codón del ARNm (morado) y el anticodón del ARNt (amarillo). Las bases críticas del ARNr 16S que se unen al complejo ARNt-ARNm se muestran en rosa.

- **Iniciación.** La iniciación en bacterias requiere de la interacción de la subunidad 30S con la secuencia de Shine-Dalgarno del ARNm que es complementaria al extremo 3' del ARNr 16S. En este proceso están implicados tres factores de iniciación IF1, IF2 e IF3<sup>36</sup> y se va a seleccionar el ARNt iniciador (ARNt-fmet).

- **Decodificación.** El apareamiento de las bases del codón del ARNm y el anticodón del ARNt es la base de la selección de un ARNt con el aminoácido correcto para añadirlo a la cadena polipeptídica en formación. La diferencia de energía de un ARNt cognado que encaja perfectamente con el codón y un ARNt casi cognado, que generalmente tiene un solo nucleótido discordante, conlleva a una tasa de error de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ .

Un ARNt cognado induce un cambio conformacional en el ribosoma en el que las bases universalmente conservadas G530, A1492 y A1493 en el sitio-A del ARNr 16S están implicadas. Cuando se une un ARNt cognado, las bases A1492 y A1493 se giran hacia fuera de la hélice 44 y en esta posición interaccionan con el surco menor de la hélice del codón-anticodón en el sitio-A. La base G530 también cambia su conformación. De esta manera A1493 interacciona con el primer par de bases del codón-anticodón mientras que A1492 y G530 interaccionan con el segundo par de bases del codón-anticodón (Figura 2). De esta manera, el ribosoma monitoriza rigurosamente los dos primeros pares de bases pero es capaz de tolerar un par de bases no canónico en la tercera posición.<sup>35</sup>

- **Elongación.** El final del proceso de iniciación deja al ARNt iniciador en el sitio-P del ribosoma y un sitio-A vacío que sirve para iniciar el ciclo de elongación. Un ARNt aminoacetilado accede al sitio-A formando un complejo ternario junto a EF-Tu (Factor de elongación Tu) y GTP (Guanosín Trifosfato). Cuando la interacción codón-anticodón es correcta se producen cambios conformacionales en el ribosoma que estabilizan la unión del ARNt y desencadenan la hidrólisis del GTP a través del EF-Tu. El ARNt oscila al sitio peptidil transferasa del 50S en un proceso llamado acomodación. Seguidamente se produce la formación del puente peptídico que implica la desacetilación del ARNt del sitio-P y la transferencia de la cadena peptídica al ARNt del sitio-A. Por lo tanto, en este punto el ribosoma tendrá un ARNt desacetilado en el sitio-P y el ARNt peptidil en el sitio-A. La cadena peptídica se irá elongando desde el centro peptidil transferasa a través del túnel en la subunidad grande del ribosoma<sup>37-39</sup> (Figura 1). Este proceso se repite hasta llegar al codón stop en donde se libera la cadena peptídica.

- **Translocación.** La translocación de los ARNts y el ARNm se facilita mediante el EF-G que es también una GTPasa. Como resultado se obtiene un ribosoma listo para la siguiente ronda de elongación, con un ARNt desacetilado en el sitio-E, el ARNt peptidil en el sitio-P y un sitio-A vacío preparado para recibir al siguiente ARNt con el aminoácido adecuado. El movimiento de translocación va a ser preciso ya que el marco de lectura del ARNm debe preservarse.

- **Terminación.** El proceso de terminación comienza cuando un codón stop del ARNm se encuentra en el sitio-A. En bacterias, el reconocimiento del codón stop envuelve a dos factores de liberación de clase I: RF1 y RF2.<sup>40</sup> Ambos reconocen el codón UAA, mientras que UAG es reconocido por RF1 y UGA por RF2. En eucariotas, un único factor, eRF1, reconoce los tres codones stop. El factor de liberación de clase II, RF3, se une al complejo RF1/2 con el ribosoma. La unión de RF1/2 a un ribosoma con el codón stop apropiado desencadena la hidrólisis y liberación de la cadena peptídica del ARNt en el sitio-P.

- **Reciclaje del ribosoma.** Después de liberarse la cadena peptídica, el ribosoma va a quedarse con el ARNm y un ARNt desacetilado en el sitio-P. Este complejo necesita desensamblarse para preparar al ribosoma para un nuevo ciclo de síntesis de proteínas. Para ello, se requiere del factor de liberación del ribosoma (RRF) junto con el EF-G.<sup>41</sup> El RRF y el EF-G conducen a la disociación del ribosoma en subunidades mediante hidrólisis de GTP<sup>42</sup> (Figura 3). A continuación, el factor de iniciación IF3 es requerido para retirar el ARNt desacetilado de la subunidad 30S. De todos los factores determinados hasta ahora, la estructura del RRF<sup>43</sup> es la más cercana en forma y distribución de cargas al ARNt, sugiriendo que imita al ARNt del sitio-A.

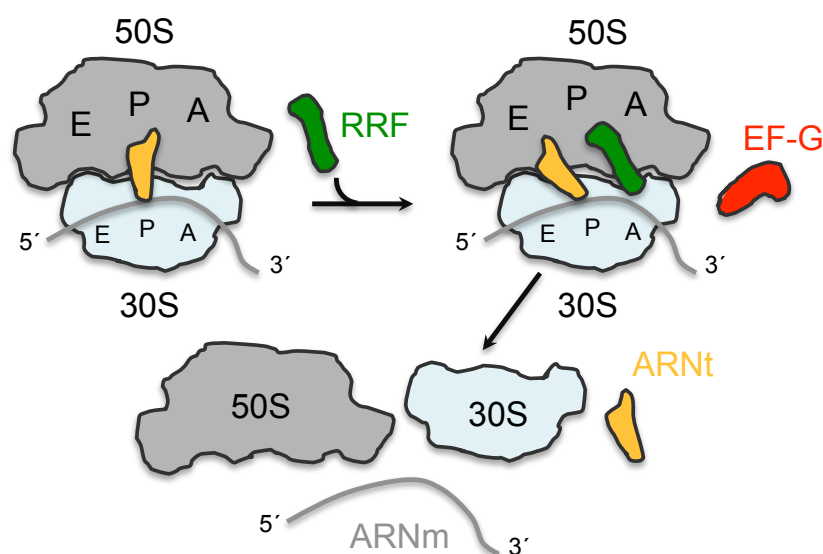


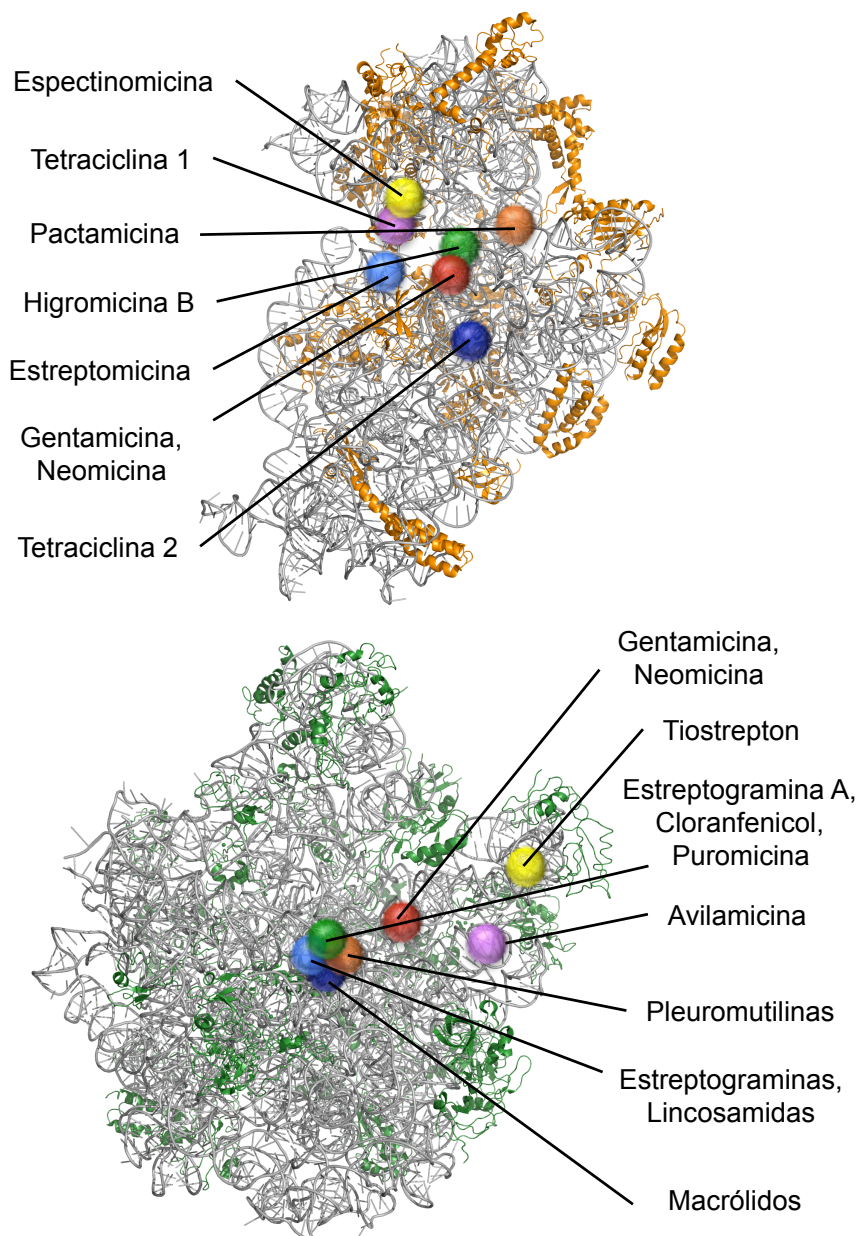
Figura 3. Reciclaje del ribosoma.

#### 1.4. Sitios de unión de los antibióticos en el ribosoma.

El ribosoma bacteriano es la diana de múltiples antibióticos que van a insertarse entre componentes cruciales del mismo impidiendo su correcto funcionamiento e interfiriendo con la síntesis de proteínas. Sorprendentemente a pesar de la diferente naturaleza química de los antibióticos que tienen como diana el ribosoma, dichos antibióticos van a unirse al mismo en localizaciones muy concretas que a menudo solapan entre sí (Figura 4). Estas dianas suelen ser centros funcionales del ribosoma tales como la región decodificante del sitio-A y las regiones de unión del ARNt en la subunidad pequeña del ribosoma y el centro peptidil transferasa, el túnel peptídico o la

región de activación de la GTPasa en la subunidad grande. La superficie de las dianas en el 30S o 50S van a consistir principalmente en regiones del ARNr y no tanto en componentes ribosomales proteicos, lo cual no resulta sorprendente dada la importancia del papel del ARNr en el funcionamiento del ribosoma. Estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) de complejos formados por aminoglucósidos y ARN sintético<sup>44</sup> aportaron la primera vista en detalle de la interacción de inhibidores de la síntesis de proteínas con su diana. A día de hoy, se han conseguido resolver estudios cristalográficos de subunidades ribosomales y su interacción con una gran variedad de antibióticos a resoluciones atómicas.<sup>1</sup>

A continuación, se presenta una breve descripción de las regiones más significativas del ribosoma que sirven de sitio de acción para algunos antibióticos (Figura 4). Sólo se pretende ahondar en lo que a los aminoglucósidos se refiere que constituirán el capítulo 2 de la introducción de esta tesis. El motivo por tanto de este esquema es señalar la importancia que infiere el ribosoma como diana para agentes antimicrobianos y situar a los aminoglucósidos dentro de los mismos.



**Figura 4. Sitios de unión de antibióticos en el ribosoma bacteriano.<sup>1</sup>** La subunidad 30S situada en la parte superior y la subunidad 50S en la inferior. Las regiones de unión de los antibióticos han sido determinadas inicialmente mediante técnicas bioquímicas y genéticas y posteriormente, muchas de ellas han sido estudiadas en mayor detalle mediante cristalografía de rayos X. Los modelos de las subunidades están basados en la estructura del ribosoma 70S de *Escherichia coli* (Protein Data Bank código 3IIM). Los ARN ribosómicos se muestran en gris en ambas subunidades. Las proteínas-r se muestran en naranja y verde en las subunidades 30S y 50S respectivamente.

*1.4.1. Dianas de acción de antibióticos en la subunidad 30S.*

**- Hélice 44, región decodificadora.**

La región decodificadora es parte del sitio-A del ribosoma y comprende la parte final de la hélice 44 (H44) del ARNr 16S que reside en la interfaz de la subunidad pequeña<sup>45</sup>. Su función es monitorizar la unión del codón del ARNm con el anticodón del aminoacil-ARNt una vez que este segundo se ha posicionado en el sitio-A del ribosoma mediante el factor de elongación Tu junto al GTP. En la región decodificadora (Figura 2), los nucleótidos A1492 y A1493, universalmente conservados, son esenciales para esta monitorización, principalmente en las dos primeras bases de cada codón.<sup>45,46</sup>

La H44 se trata de la diana principal de los aminoglucósidos, en concreto de los 2-desoxiestreptaminos (2-DOS), que son el grupo de aminoglucósidos más extenso y de mayor relevancia clínica. La higromicina B es un aminoglucósido no perteneciente al grupo de los 2-DOS pero que también se une a la H44.<sup>47</sup>

En el capítulo II se desarrollará en mayor profundidad esta región del ribosoma así como el mecanismo de acción de los aminoglucósidos ya que son el principal objeto de estudio de esta tesis.

**- Sitio de unión del ARNt.**

Las tetraciclinas impiden la síntesis de proteínas interfiriendo en la unión del aminoacil-ARNt a su lugar de unión en el sitio-A del ARNt.<sup>48</sup> Sin embargo, la hidrólisis del GTP dependiente del EF-Tu no va a afectarse. Las tetraciclinas presentan múltiples dianas en la subunidad 30S del ribosoma. El principal sitio de unión está localizado entre el surco menor de la hélice 34 (H34) y el tallo-bucle de la hélice 31 (H31), próximo a la región del sitio-A en donde se sitúa el aminoacil-ARNt.<sup>49</sup> Concretamente, este sitio de unión está constituido por el bolsillo formado por los residuos 1054-1056 y 1196-1200 de la H34 y 964-967 de la H31. Las bases 1196 y 1054, que apuntan hacia fuera de la H34, están orientadas hacia el sitio-A formando una grapa que sujeta a la molécula de tetraciclina mediante interacciones hidrofóbicas separando ligeramente a estas dos bases. El segundo sitio de unión de las tetraciclinas



se encuentra localizado en un bolsillo hidrofóbico de la proteína-r S4 siendo el único lugar de unión de las tetraciclinas en donde el ARNr 16S no está implicado.<sup>50</sup>

#### **- Otras regiones en el 30S.**

En cuanto a la estreptomicina, su diana de acción va a ser algo diferente a la de los aminoglucósidos pertenecientes al grupo de los 2-DOS. Su mecanismo de acción se basa en la interferencia tanto de la selección inicial del ARNt como en la veracidad de la lectura.<sup>51</sup> Muestra interacciones con la H27, el bucle 530 en la H18, la H44 y K45 de la proteína ribosomal S12.

La espectinomicina es otro derivado de la familia de los aminoglucósidos que impide la translocación del peptidil-ARNt catalizada mediante el factor de elongación G desde el sitio-A al sitio-P en el 30S.<sup>52</sup> Se va a unir al surco menor en uno de los extremos de la H34, presentando las máximas interacciones con los nucleótidos G1064 y C1192.<sup>53</sup>

La pactamicina promueve cambios estructurales en el 30S que previenen la unión del ARNt<sup>54</sup> simulando dos bases de RNA consecutivas.<sup>55</sup> A concentraciones altas también afecta a la elongación ya que interacciona con el sitio-E y empuja al ARNm desplazándolo de su sitio.<sup>56</sup>

#### *1.4.2. Dianas de acción de antibióticos en la subunidad 50S.*

#### **- Tunel de salida del péptido.**

El nuevo péptido sintetizado pasa a través del túnel de salida en la subunidad 50S,<sup>57,58</sup> de aproximadamente 100 Å de largo, y que comprende desde el centro peptidil transferasa (CPT) hasta la cara posterior del ribosoma por la cual el péptido naciente irá emergiendo. La pared interna del túnel es altamente irregular en cuanto a forma y la parte superior cercana a la interfaz está constituida principalmente por ARNr. La región más estrecha del túnel se encuentra en la curva en donde los giros de las beta-láminas de las proteínas-r L4 y L22 emergen junto a las estructuras de ARNr. Esta región del túnel actúa a modo de sensor y punto de control en el que la síntesis de ciertos péptidos puede detenerse en función de los requerimientos metabólicos de la

célula.<sup>59-61</sup> Esta región también es la diana de unión de los MLS<sub>B</sub> (macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B). Las regiones de interacción de estos antibióticos van a solaparse<sup>62,63</sup> siendo A2058 del ARNr 23S un nucleótido de contacto común clave en la interacción y resistencia a los MLS<sub>B</sub>. La unión de estos antibióticos a su diana bloquea la progresión de las proteínas nacientes a través del túnel, lo que en definitiva causa una detención de la elongación del péptido.<sup>1</sup>

#### **- Centro peptidil transferasa.**

El cloranfenicol bloquea la actividad del centro peptidil transferasa (CPT) dificultando la unión del ARNt al sitio-A.<sup>64</sup>

Así mismo, otros antibióticos como la puromicina,<sup>28</sup> las pleuromutilinas<sup>65</sup> y las oxazolidinonas<sup>66</sup> también tienen su diana de acción en el CPT. La puromicina es un análogo de aminoacil ARNt que se une fuertemente al sitio-A impidiendo también la actividad peptidil transferasa. A su vez, las pleuromutilinas actúan igualmente en el sitio-A de unión al ARNt en el CPT y solapan a su vez parcialmente con el sitio-P de unión al ARNt. Las oxazolidinonas también van a presentar su diana de acción en torno al CPT.

#### **- Región activadora GTPasa.**

Los tiopéptidos se unen al centro GTPasa del ribosoma e inhiben los pasos posteriores a la hidrólisis del GTP del factor de elongación G como son la liberación del fosfato y la translocación, y también ralentizan la liberación del factor de elongación G del ribosoma.<sup>67</sup>

#### **- Hélice 69, región de unión y reciclaje del ribosoma.**

Los aminoglucósidos pertenecientes al grupo de los 2-DOS tienen como diana, además de la hélice 44 en el ARNr 16S, la hélice 69 del 23S. La región de la hélice 69 es funcionalmente importante ya que establece uno de los puentes de unión entre las dos subunidades. Interacciona con la hélice 44 en la interfaz de las dos subunidades formando el puente B2a.<sup>49</sup> Esta región también es clave en el reciclaje del ribosoma ya que el puente B2a debe disolverse para permitir la separación de las dos subunidades.

Por lo tanto, la unión de los aminoglucósidos a la hélice 69 dificultará su funcionalidad.

Esta región del ribosoma también se desarrollará de manera más extensa en el capítulo II al ser la diana secundaria de los aminoglucósidos, objeto de estudio de este trabajo.

#### **- Otras regiones en el 50S.**

La everninomicina<sup>68</sup> y avilamicina<sup>69</sup> se unen a las horquillas 89 y 91 del ARNr 23S. Van a inhibir el emplazamiento en el ribosoma del factor de iniciación 2 (IF-2), que se une al ARNt iniciador y controla su entrada al ribosoma.<sup>68</sup>

### **1.5. Modificaciones endógenas post-transcripcionales en el ARN ribosómico.**

La adición post-transcripcional de modificaciones se lleva a cabo mediante enzimas codificadas en el cromosoma que actúan de manera sincronizada. Su función es la de terminar de modelar el ribosoma, que adquiere de esta manera su conformación final, llevando a cabo de manera eficiente la síntesis de proteínas. A lo largo de este trabajo se empleará de manera indistinta la palabra endógena, intrínseca o fisiológica para referirnos a este tipo de modificaciones.

Dichas modificaciones, no se sitúan de manera dispersa por el ribosoma sino que se agrupan en regiones discretas implicadas en funciones esenciales del ribosoma que en ocasiones, también son diana de antibióticos. Estas modificaciones son en su mayoría metilaciones de nucleósidos en la base o en el 2'-hidroxilo de la ribosa o pseudouridilaciones ( $\Psi$  5-ribosyl-uracyl).<sup>70</sup> Muchas de ellas se conservan entre diferentes microorganismos mientras que otras son específicas de ciertos grupos de bacterias o arqueas. Este agrupamiento de metilaciones (principalmente) implica que exista un orden evolutivo de metilación para evitar tanto que las metilasas se obstaculicen entre sí como posibles efectos obstructivos estereoeléctricos inducidos por dichas metilaciones. Estas modificaciones van a participar además de en el modelado final del ribosoma, favoreciendo interacciones intermoleculares,<sup>71</sup> en el

ensamblaje de la subunidad 30S<sup>72,73</sup> y en algunos casos en la resistencia a antibióticos.<sup>71</sup>

Las modificaciones post-transcripcionales se han mapeado por diferentes técnicas, incluyendo la espectrometría de masas MALDI.<sup>74</sup> El mapa de *E. coli* ha revelado 11 nucleótidos modificados en el ARNr 16S y 25 en el ARNr 23S (Tabla 2).

#### *1.5.1. Metilaciones.*

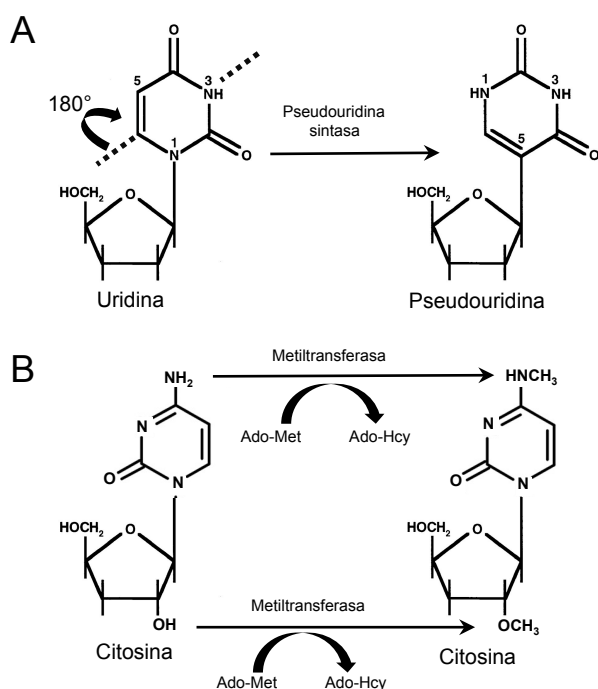
Las metiltransferasas (MTasas) son una superfamilia de proteínas muy diversa y de gran importancia biológica que transfieren un grupo metilo empleando comúnmente S-adenosil metionina (Ado-Met o SAM) como grupo donador y por tanto se va a caracterizar por tener un dominio SAM-mtase. Se trata de un dominio responsable de la unión a Ado-Met y del proceso catalítico. El dominio PUA que tienen algunas metiltransferasas es responsable del reconocimiento del sustrato (ARNr y el complejo r-proteína). La molécula de Ado-Met es un co-sustrato que participa en la transferencia de grupos metilo. Se compone de adenosina trifosfato (ATP) y metionina. Las metilasas utilizan Ado-Met como sustrato y tras la reacción de metilación, la base o el 2'-hidroxilo de la ribosa gana un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) y el donador Ado-Met se convierte en S-adenosil homocisteína (Ado-Hcy) (Figura 5).

#### *1.5.2. Pseudouridilaciones.*

Las formación de pseudouridinas ( $\Psi$ ), mediada por las pseudouridina-sintasas, se lleva a cabo a partir de un uracilo por la escisión de la unión N-glycosyl, rotación del anillo uracilo sobre uno de sus ejes de manera que la posición que ocupaba anteriormente el C-5 pasa a estar ocupada por el N-1 y nuevamente formación de la unión glycosyl mediante una unión C-C. En este proceso el hidrógeno del C-5 se libera formando agua.<sup>75</sup> La formación de  $\Psi$  tiene lugar en uridinas específicas únicamente después de que se hayan incorporado en una cadena de polinucleótidos. Éstas se encuentran únicamente en ARNs cuya estructura terciaria es fundamental para su respectiva función como es el caso del ARNr, del ARNt y del ARNnp. El efecto

estructural más obvio es la formación de un nuevo sitio de enlace donador de hidrógeno donde solía estar la posición C-5. Este hecho sugiere que  $\Psi$  debe ser un estabilizador de interacciones estructurales intermoleculares e intramoleculares.

En principio, metilaciones y pseudouridilaciones tienen efectos opuestos en la estructura del ARNr y sus interacciones con otros componentes ribosomales. La metilación de la base o ribosa crea un parche hidrofóbico que dificulta la aproximación a otros componentes o ligandos. Las pseudouridinas, en cambio, ganan un sitio extra para una interacción electrostática después de que el N1 que era originalmente parte del puente glucosídico de la ribosa, cambie su rol con el C5 pasando a estar libre para formar un puente de hidrógeno. El N3 permanece en la misma posición tanto en la uridina como en la pseudouridina (Figura 5).



**Figura 5. Reacciones de pseudouridilación (A) y metilación en la base y en la ribosa (B).**

**Tabla 2. Nucleótidos modificados del ARNr en *Escherichia coli* y sus respectivas enzimas modificadoras.**

Nucleótido	Modificación	Enzima modificadora		Referencia
		Nombre	Sinónimo	
16S rRNA				
516	Ψ	RsuA	YejD	76
527	m <sup>7</sup> G	RsmG	GidB	77
966	m <sup>2</sup> G	RsmD	YhhF	78
967	m <sup>5</sup> C	RsmB	Fmu, YhdB	79,80
1207	m <sup>2</sup> G	RsmC	YjjT	81
1402	m <sup>4</sup> Cm	RsmH, RsmI	MraW, YraL	82
1407	m <sup>5</sup> C	RsmF	YebU	83
1498	m <sup>3</sup> U	RsmE	YggJ	84
1516	m <sup>2</sup> G	RsmJ	YhiQ	85
1518	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	RsmA	KsgA	86
1519	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	RsmA	KsgA	86
23S rRNA				
745	m <sup>1</sup> G	RlmA	RrmA, YebH	87
746	Ψ	RluA	YabO	88
747	m <sup>5</sup> U	RlmC	YbjF, RumY, ceCB	89
955	Ψ	RluC	YceC	90,91
1618	m <sup>6</sup> A	RlmF	YbiN	92
1835	m <sup>2</sup> G	RlmG	YgjO	93
1911	Ψ	RluD	Yfil	91,94
1915	m <sup>3</sup> Ψ	RluD	Yfil	91,94
		RlmH	YebA	95,96
1917	Ψ	RluD	Yfil	91,94
1939	m <sup>5</sup> U	RlmD	YgcA, RumA	89,97
1962	m <sup>5</sup> C	RlmI	YccW	98
2030	m <sup>6</sup> A	RlmJ	yhiR	99
2069	m <sup>7</sup> G	RlmK		100
2251	Gm	RlmB	Yjfh	101
2445	m <sup>2</sup> G	RlmL	YcbY	102
2449	D	RldA		–
2457	Ψ	RluE	YmfC	103
2498	Cm	RlmM	YgdE	104
2501	*C	RltA		–
2503	m <sup>2</sup> A	RlmN	YfgB	105
2504	Ψ	RluC	YceC	90,91
2552	Um	RlmE	FtsJ, RrmJ	106,107
2580	Ψ	RluC	YceC	90,91
2604	Ψ	RluF	YjbC	103
2605	Ψ	RluB	YciL	103

## CAPÍTULO II. AMINOGLUCÓSIDOS.

### 2.1. Definición de antibiótico.

Originalmente este término se ha empleaba para denominar a cualquier molécula de origen microbiano, producida durante su metabolismo, que a bajas concentraciones inhibía o mataba a microorganismos susceptibles sin ser tóxico para el hospedador.

En 1941, Selman Waksman fue el responsable de bautizar a estas sustancias como “antibióticos”. No obstante, en 1889, el microbiólogo francés Jean Paul Vuillemin ya creó el término “antibiosis” para referirse al efecto antagónico en el crecimiento de dos microorganismos.

Este concepto se amplió para incluir a moléculas semisintéticas mientras que los agentes antibacterianos sintetizados totalmente por el hombre no fueron incluidos en un principio sino que se denominaban como agentes antibacterianos. Sin embargo, el uso continuado del termino “antibiótico” ha llevado a extender su empleo para referirse a cualquier sustancia que posea actividad antibacteriana y con toxicidad reducida para el hospedador.<sup>108</sup>

### 2.2. Origen y función de los antibióticos.

Los antibióticos no son simplemente un grupo aislado de componentes naturales que inhiben el crecimiento de las bacterias sino que forman parte de una familia más grande de compuestos que se conocen con el nombre de metabolitos secundarios.<sup>109</sup> No son esenciales para el crecimiento normal y reproducción de los microorganismos que los sintetizan pero se producen generalmente en una fase idiosincrática del metabolismo separada de las actividades endógenas esenciales. En los microorganismos el metabolismo secundario ocurre principalmente después de la fase de crecimiento rápido ligado a los cambios en los niveles de nutrientes y otros parámetros medioambientales. Estos mecanismos son frecuentemente inducibles aunque a veces pueden ser constitutivos. Las enzimas implicadas en la producción de metabolitos secundarios suelen estar agrupadas en forma de genes que incluyen reguladores específicos, siendo esta regulación en muchos casos a nivel de

transcripción y menos común a nivel de traducción. En hábitats nutricionalmente ricos, tales como el tracto gastrointestinal donde viven las bacterias entéricas, los metabolitos secundarios no tienen la misma importancia como en el agua o en la tierra en donde los nutrientes limitan el crecimiento bacteriano.

Los microorganismos que en primer lugar se conocieron como productores de antibióticos fueron los hongos siendo la penicilina, producida por el hongo *Penicillium rubens*, el primer antibiótico descubierto en 1928 por Alexander Flemming.<sup>110</sup> Otros microorganismos conocidos por ser productores de antibióticos son los actinomicetos ambientales siendo estas bacterias ubicuas las responsables de conferir a la tierra su olor. El género *Streptomyces* es el que mayor número de antibióticos conocidos distintos produce. Los organismos productores de antibióticos suelen ser resistentes a la toxicidad de sus propios metabolitos puesto que han desarrollado mecanismos para su propia protección evitando de esta manera el suicidio.<sup>111</sup>

La palabra “antibiótico”, que se ha empleado para denominarlos, nos ha conducido a pensar en un arma química natural. De todas formas, puede que los antibióticos no estén todos producidos por una única razón. Desde su descubrimiento se han tenido siempre en cuenta los efectos que producen a concentraciones inhibitorias ya que se han empleado con fines terapéuticos. No obstante, es conocido que los antibióticos producidos de forma natural a concentraciones subinhibitorias pueden afectar a la expresión de genes con funciones celulares, determinando algunas de ellas interacciones medioambientales entre microorganismos. Esto indica que los antibióticos en la naturaleza pueden actuar como moléculas señal que facilitan las interacciones intra- o interespecies en las comunidades bacterianas<sup>112</sup>. Cabe además destacar que en el nicho natural de los actinomicetos, productores de antibióticos por excelencia, los microorganismos más probables a encontrar en su entorno son los de su misma clase. Por tanto, puede ser que estos microorganismos no estén tratando de eliminar a otros microorganismos diferentes a ellos mismos, aunque en ocasiones lo hagan, si no de comunicarse con los de su propia especie como se ha sugerido anteriormente.<sup>113</sup>



### 2.3. Selman Waksman y los aminoglucósidos.

Tras la identificación de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias del suelo; el grupo de Selman Waksman se embarcó en la búsqueda de antibióticos, lo que les llevó a la identificación en 1940 del primer antibiótico producido por un actinomiceto, la actinomicina.<sup>114</sup> Este hallazgo fue el comienzo de la era de oro del descubrimiento de antibióticos en la que destacarían los actinomicetos como microorganismos productores.

En 1944 Waksman y su discípulo Albert Schatz descubrieron la estreptomicina, el primer aminoglucósido-aminociclitol proveniente de un cultivo de *Streptomyces griseus*.<sup>115</sup> La estreptomicina fue el primer antibiótico que mostró ser efectivo frente a la tuberculosis, una de las enfermedades infecciosas más importantes a lo largo de la historia. De esta manera, la introducción de su uso en medicina supuso un cambio monumental en el tratamiento de la enfermedad. Tal descubrimiento le llevaría a Waksman a ser galardonado con el premio Nobel en Medicina en 1952. Anteriormente, en 1949, descubriría un segundo aminoglucósido, la neomicina, producida por *S. fradiae*.

La toxicidad asociada a la neomicina y la reciente aparición de la resistencia a la estreptomicina impulsó, en los años 50 y principios de los 60, el descubrimiento de otros aminoglucósidos. Es el caso de la kanamicina, por el grupo de Umezawa en Japón aislada por primera vez de *S. kanamyceticus*,<sup>116</sup> y la gentamicina, por Weinstein en Schering producida por *Micromonospora purpurea* (posteriormente denominada *M. echinospora*),<sup>117</sup> ambos de uso clínico. Estos aminoglucósidos mostraron una gran efectividad frente a Gram-negativos así como frente a algunos Gram-positivos. No obstante, la resistencia a kanamicina asociada principalmente a la modificación enzimática de la molécula fue descrita a finales de los años 60.<sup>118,119</sup> La emergencia de mecanismos de resistencia unida a la toxicidad producida por los aminoglucósidos impulsó durante las dos siguientes décadas a la búsqueda de nuevas moléculas tanto naturales como derivadas de los mismos. En 1975 se aprobó la dibekacina, el primer aminoglucósido semisintético para su uso a nivel terapéutico. El derivado semisintético más reciente ha sido la arbekacina, derivada de la kanamicina B, a la cual no le afectaban las enzimas modificadoras de aminoglucósidos más comunes y que se

introdujo en Japón en los años 90.<sup>120</sup> No obstante, la gran capacidad evolutiva de los microorganismos, su plasticidad genética y el alto poder de los antibióticos para seleccionar los mecanismos de resistencia demostraron hacer frente a todos los aminoglucósidos en uso. Además, a pesar del amplio espectro y efecto bactericida de los aminoglucósidos, otros antibióticos con menores efectos secundarios tales como las fluoroquinolonas así como las carbapenemas, cefalosporinas y  $\beta$ -lactámicos asociados a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas los han ido desplazando, de manera que no se ha introducido ningún aminoglucósido nuevo desde hace más de 20 años. A pesar de ello, el incremento en la aparición de mecanismos de resistencia al resto de los antibióticos comúnmente empleados en clínica ha hecho que los aminoglucósidos vuelvan a cobrar interés, especialmente en lo que se refiere a infecciones nosocomiales y en concreto a infecciones graves causadas por Gram-negativos.

La plazomicina, llamada en un principio ACHN-490, es un aminoglucósido derivado de la sisomicina cuyo desarrollo clínico se encuentra actualmente en ensayos de fase II. Por el momento, los estudios a nivel humano no han reportado nefrotoxicidad u ototoxicidad,<sup>I</sup> siendo ambos los problemas principales que limitan el empleo de estos antibióticos. Este aminoglucósido de nueva generación ha demostrado actividad frente a patógenos Gram-negativos y Gram-positivos e incluso frente cepas portadoras de enzimas modificadoras de aminoglucósidos.<sup>II</sup> Además ha demostrado, *in vitro*, actividad sinérgica frente a *Staphylococcus aureus* resistente a ampicilina y vancomicina cuando se combina con daptomicina o ceftobiprole, así como frente a *Pseudomonas aeruginosa*, en combinación con cefepime, doripenem, imipenem o piperacilina-tazobactam. No obstante, no es activa frente aquellos aislados que presentan una metiltransferasa del ARNr 16S que confiere altos niveles de resistencia a aminoglucósidos.<sup>III 121</sup>

---

<sup>I</sup> Efectos tóxicos comúnmente producidos por los aminoglucósidos explicados en el apartado 2.8. de este capítulo.

<sup>II</sup> Mecanismo de resistencia que confiere resistencia frente a los aminoglucósidos explicado en el tercer capítulo.

<sup>III</sup> Mecanismo de resistencia que confiere resistencia frente a los aminoglucósidos explicado a lo largo del tercer capítulo y objeto de estudio de esta tesis.

## 2.4. Estructura química y clasificación de los aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos son una familia de antibióticos que se caracterizan por tener un núcleo aminociclitol o ciclitol unido a azúcares aminados (aminoglucósidos propiamente dichos) o no aminados (glucósidos) a través de enlaces glucosídicos. A día de hoy, se han aislado más de 150 aminoglucósidos sintetizados de manera natural por actinobacterias, la mayoría producidos por los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora*.

Los miembros más conocidos de esta familia son los formados por un aminociclitol unido a uno o varios aminoazúcares mediante un enlace glucosídico: aminoglucósidos aminociclitales. No obstante, compuestos tales como la espectinomina, la cual se forma a partir de la actinamina que es un aminociclitol no unido a aminoazúcares, o compuestos como la kasugamicina, cuyo núcleo está formado por un alcohol cíclico no aminado, también se encuentran incluidos en esta familia.<sup>108,122</sup>

La tabla 3 muestra una clasificación detallada de los aminoglucósidos. No obstante, dada la importancia de los 2-desoxiestreptaminos (2-DOS) dentro de los aminoglucósidos, en muchas ocasiones se van a clasificar únicamente dos grupos: los 2-desoxiestreptaminos y el resto de los aminoglucósidos.

Los **2-desoxiestreptaminos**, es el grupo más amplio y con mayor relevancia terapéutica. Éste a su vez se divide en varios subgrupos según la posición del anillo desoxiestreptamino en el que se localicen las sustituciones glucosídicas, siendo los de mayor importancia aquellos que presentan dichas sustituciones en las posiciones 4,5 o 4,6.

El grupo de los 4,5-disustituídos desoxiestreptaminos incluye las neomicinas, paromomicina, butirosinas, ribostamicina y lividomicina. Todas ellas además incluyen una ribosa en fórmula.

El grupo de los 4,6-disustituídos desoxiestreptaminos comprende a la mayoría de los aminoglucósidos de uso clínico por lo que algunos de ellos se han empleado como molde para el diseño de aminoglucósidos semisintéticos.<sup>123</sup> En este grupo se sitúa la familia de las kanamicinas que incluye a la kanamicina A y sus derivados

(didesoxikanamicina y amikacina), kanamicina B y derivados (dibekacina y arbekacina) y tobramicina. Así mismo contiene a la familia de las gentamicinas que comprende a la gentamicina B y su derivado (isepamicina), a la sisomicina y su derivado (netilmicina), gentamicina C, micronomicina y geneticina.

En los desoxiestreptaminos, los sustituyentes en el anillo 2-desoxiestreotamino están numerados 1,6; los sustituyentes en el amino azúcar que están unidos por un puente glicosídico a la posición 4 se numeran 1',6' y los sustituyentes en la posición 5 o 6 del anillo 2-desoxiestreptamino se numeran 1'',6'', etc. (Figura 6).

En el caso de la estreptomycin y sus derivados, que contienen una estreptidina sustituida, los átomos de carbono de su anillo se numeran 1,6 y los demás anillos se numeran secuencialmente 1'',6'', etc. (Figura 7).<sup>108</sup>

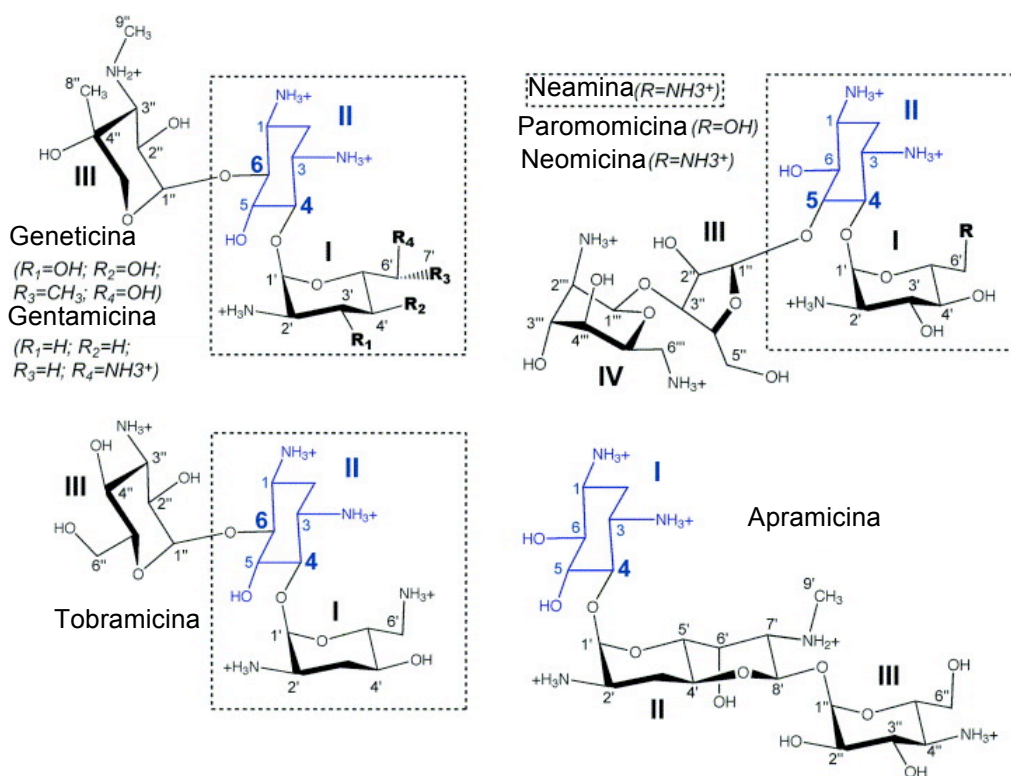
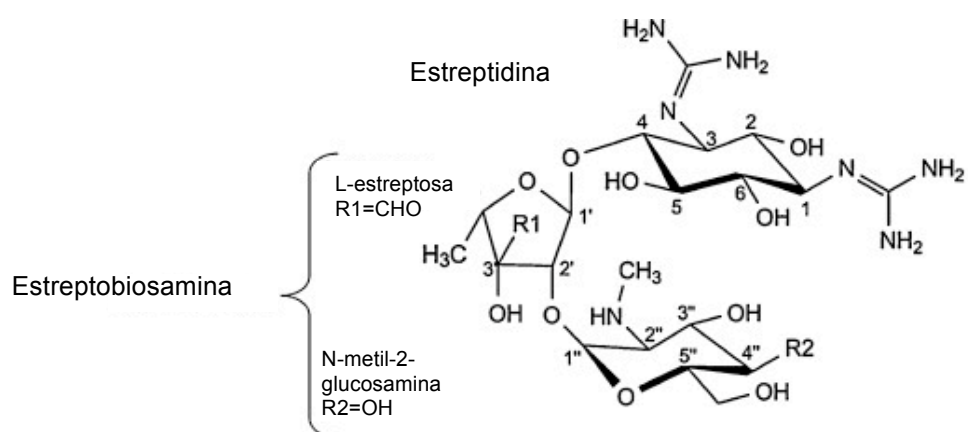


Figura 6. Estructura química de los aminoglucósidos que incorporan un anillo 2-desoxiestreptamino (2-DOS).<sup>124</sup> El anillo 2-DOS aparece marcado en azul.



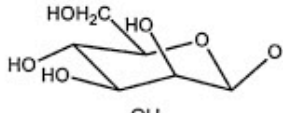
	R1	R2
Estreptomicina A	CHO	OH
Estreptomicina B	CHO	
Dihidroestreptomicina	CH <sub>2</sub> OH	OH

Figura 7. Estructura química de la estreptomicina.<sup>125</sup>

Tabla 3. Clasificación de los aminoglucósidos.

Grupos	Alcohol cíclico	Sustitución glucosídica	familia	Antibiótico natural	Derivado semisintético
Aminoglucósidos aminociclitolos	Estreptidina	4-	Estreptomicina	Estreptomina <sup>a</sup>	
	Fortamina	6-	Fortimicina	Astromicina <sup>a</sup>	
	2- Desoxiestreptamina	4-	Apramicina	Apramicina <sup>b</sup>	
		4,5-	Neomicina	Neomicinas <sup>a</sup>	
				Paromomicina <sup>a</sup>	
				Lividomicinas	
				Ribostamicina <sup>a</sup>	
				Butirosina	
		4,6-	Kanamicina	Kanamicina <sup>a</sup>	Amikacina <sup>a</sup> , Didesoxikanamicina <sup>a</sup>
				Kanamicina B	Dibekacina <sup>a</sup> , Arbekacina <sup>a</sup>
Glucósidos aminociclitolos				Tobramicina <sup>a</sup>	
			Gentamicina	Gentamicina C <sup>a</sup>	
				Gentamicina B	Isepamicina <sup>a</sup>
				Micronomicina <sup>a</sup>	
				Sisomicina <sup>a</sup>	Netilmicina <sup>a</sup>
				Geneticina <sup>c</sup>	
		5-	Destomicina	Destomicina A <sup>d</sup>	
				Higromicina B <sup>d</sup>	
		4,5-	Espectinomicina	Espectinomicina <sup>a</sup>	
		6-		Kasugamicina <sup>e</sup>	

<sup>a</sup> Uso clínico.

<sup>b</sup> Exclusivamente para uso clínico en veterinaria.

<sup>c</sup> Agente antihelmíntico veterinario.

<sup>d</sup> Agente empleado biología molecular.

<sup>e</sup> Prevención de enfermedades en plantas.

## 2.5. Propiedades y vías de administración.

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas. Se trata de compuestos orgánicos básicos con un  $pK_a$  entre 7,5 y 8. Su peso molecular es bajo, de entre 500 y 800 moles. Se suelen emplear en forma de sulfato hidrosoluble siendo su presentación a modo de polvo. Las soluciones son estables durante varios meses a temperatura ambiente y pH neutro. Son estables al calor (por lo que pueden ser incorporados en cementos en ortopedia). Sin embargo, van a ser sensibles a variaciones en el pH siendo su pH óptimo entre 7,5 y 8,5.<sup>108</sup>

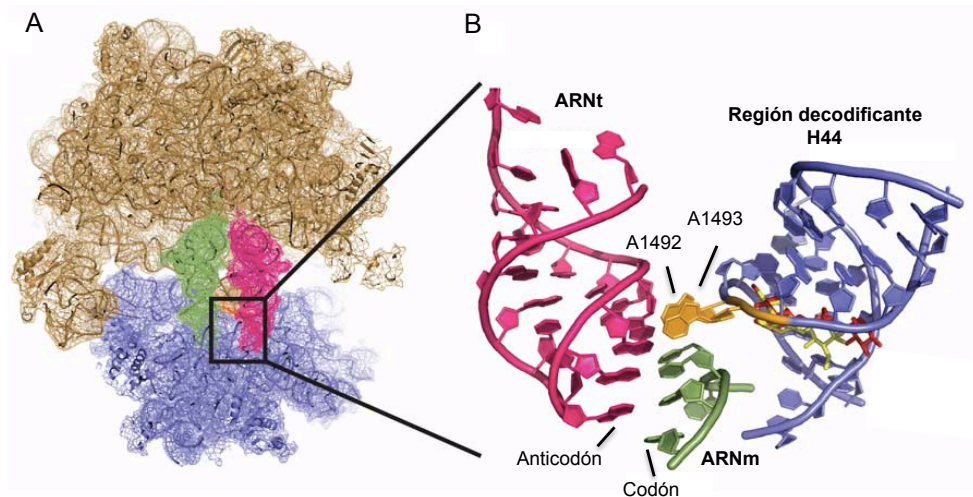
La ruta más común de administración de los aminoglucósidos en el tratamiento de infecciones sistémicas es por vía parenteral, inyección intramuscular o intravenosa en casos de infecciones severas. La terapia convencional recomendada ha establecido múltiples dosis diarias. No obstante, se ha observado que una terapia de dosis única, siempre y cuando los pacientes tengan una actividad renal normal, aporta una eficacia similar y minimiza los efectos tóxicos<sup>126</sup> siendo más beneficioso para los pacientes. La vía inhalatoria se emplea en infecciones respiratorias reduciendo de esta manera los efectos adversos de la vía sistémica. La administración oral no es posible para este tipo de infecciones debido a los bajos niveles de absorción. No obstante, la vía oral puede utilizarse con el fin de eliminar la flora del intestino antes de realizar una cirugía intestinal.<sup>122,127,128</sup>

## 2.6. Mecanismo de acción.

Como se ha señalado anteriormente, los aminoglucósidos van a perturbar la síntesis de proteínas en el ribosoma bacteriano.<sup>129,130</sup> El grupo de los 2-DOS, grupo más relevante de aminoglucósidos y el en el cual nos centraremos, presenta dos dianas de unión al ribosoma situadas en la hélice 44 del ARNr 16S y en la hélice 69 del ARNr 23S.

### 2.6.1. Diana en la hélice 44 del sitio-A del ARNr 16S.

Situada en la subunidad 30S, concretamente en la región decodificadora del ARNm del ARNr 16S. Aquí los aminoglucósidos se unen al surco mayor de la región decodificante del sitio-A en la hélice 44 (H44) del ARNr 16S, siendo éste el lugar en donde se lleva a cabo la monitorización de las interacciones entre el codón del ARNm y el anticodón del ARNt.<sup>44,51,124,131,132</sup> Los aminoglucósidos 2-DOS se unen principalmente en esta región e interaccionan específicamente con los nucleótidos conservados G1494 y U1495. El anillo I de los 2-DOS se une al bolsillo formado por los nucleótidos A1492 y A1493 universalmente conservados y al nucleótido específico de procariotas A1408.<sup>133,134</sup>



**Figura 8. Diana de unión de los aminoglucósidos en la H44 del ARNr 16S.**<sup>135</sup> (A) Estructura del ribosoma procariota 70S. La región decodificante aparece recuadrada y contiene la porción de la H44 del ARNr 16S correspondiente con la diana primaria de unión a los aminoglucósidos. (B) Vista de cerca de la región de monitorización de la decodificación del ARNr 16S (azul). Las bases A1492-A1493 (naranja) giran hacia fuera, cuando la unión codón-anticodón es cognada o en presencia de aminoglucósidos, interaccionando con el ARNt (magenta) y el ARNm (verde). Una molécula de gentamicina (amarilla) y otra de neomicina (roja) aparecen superpuestas y unidas a su diana primaria en la H44.

En condiciones normales, el complejo ARNm-ARNt se une en el surco mayor de la región decodificante del ARNr 16S, situado en la H44 del sitio-A, manteniendo interacciones con los nucleótidos A1492, A1493 y C1400. A1492 y A1493



interaccionan con el codón del sitio-A independientemente de su secuencia. Esta interacción es un mecanismo de corrección o chequeo de la lectura del ribosoma que requiere la distinción entre ARNt emparentados y no emparentados morfológicamente con sus respectivos ARNm. Cuando un ARNt cognado se une al sitio-A, se forman los puentes de hidrógeno necesarios entre A1492-A1493 y el ARNm. Sin embargo, cuando un ARNt no cognado intenta unirse, la orientación de A1492 y A1493 se ve distorsionada de manera que no se forman las interacciones adecuadas con el ARNm. Además, el ARNm en el sitio-P se sitúa en una región de alta densidad mientras que en el sitio-A la región en donde está situado el ARNm es de una densidad relativamente baja. Cuando un ARNt cognado se une al ARNm en el sitio-A, el canal se estrecha y la densidad aumenta. Esta conformación perfectamente definida es una señal que desencadena que el ribosoma proceda a la transpeptidación y translocación. El eje del sitio de decodificación es perpendicular al eje de la subunidad 30S siendo entonces el sitio de decodificación paralelo al movimiento de los anticodones durante la translocación. De esta manera se cree que el mecanismo de empuje del ARNm a través del canal es similar al de una carraca.<sup>136</sup>

El error de la tasa de traducción es aproximadamente de 1 aminoácido por cada  $10^4$  aminoácidos sintetizados.<sup>137</sup> En la presencia de aminoglucósidos la tasa de error aumenta para ribosomas procariotas en 1 error por cada 500 aminoácidos. La discriminación del ribosoma de ARNt cognados y casi cognados se consigue mediante una serie de pasos en los cuales los ARNt casi cognados se rechazan más rápidamente que los ARNt cognados que inducen unos cambios de conformación específicos que conllevan a una rápida selección del ARNt correcto. Los aminoglucósidos van a perturbar este proceso de selección.<sup>138</sup> Para la unión ARNt-ARNm en el sitio-A del ribosoma, se requiere la posición N-1 de los nucleótidos A1492 y A1493, que están en el bolsillo de unión de los aminoglucósidos. Cuando el anticodón del ARNt y el codón de ARNm son cognados adoptan una geometría que permite al ribosoma reconocer los grupos 2'-OH en el sitio-A del ARNm que interaccionan con los grupos N-1 de A1492 y A1493 en ARNr. Estos contactos específicos dan lugar a una señal en la subunidad 30S del ribosoma que es transmitida a la subunidad 50S. Las uniones codón-anticodón no cognadas o casi cognadas conllevan a una geometría de las hélices diferente con pares de bases desapareados que distorsionan la hélice formada por el ARNm-ARNt de manera que no es reconocida por A1492 y A1493 y la señal conformacional es muy

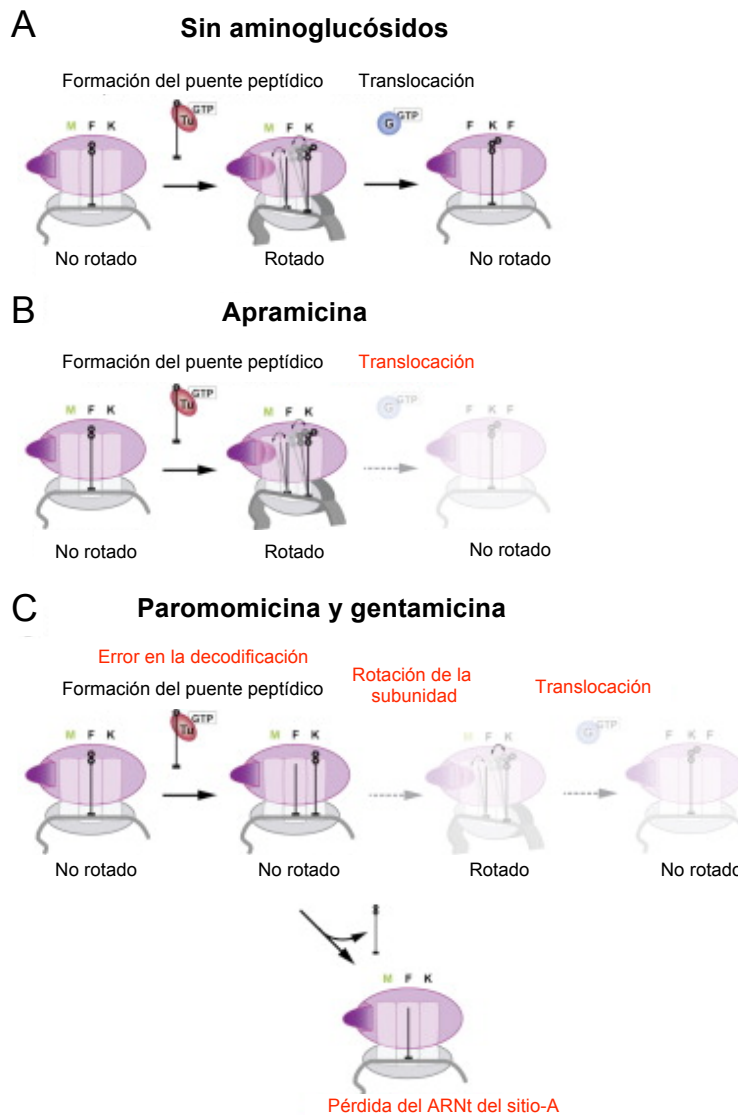
pobre. La unión de los aminoglucósidos desplaza A1492 y A1493 hacia el surco menor pudiendo imitar las señales conformacionales que normalmente se inducen cuando la unión ARNt-ARNm es la correcta (Figura 8).

Tradicionalmente se ha asociado el mecanismo de acción de los aminoglucósidos a la disminución de la fidelidad en la traducción como consecuencia de la unión de los aminoglucósidos en la H44 del ARNr 16S, aún siendo dicho efecto por sí solo insuficiente para explicar la muerte celular. Posteriormente, también se ha comprobado el impacto de los aminoglucósidos en otras etapas de la traducción como la rotación y la translocación del ribosoma.<sup>139</sup> Recientemente, se ha estudiado en profundidad el modo de acción de tres aminoglucósidos dentro de la familia de los 2-DOS que pertenecen a tres clases estructurales diferentes: apramicina (anillos fusionados), paromomicina (4,5-2-DOS) y gentamicina (4,6-2-DOS).<sup>139</sup>

En condiciones normales, para cada ciclo de elongación el ribosoma rota el cuerpo de la subunidad 30S con respecto a la subunidad 50S y a continuación revierte de nuevo la rotación. Esto se controla mediante la formación del puente peptídico tras la acomodación del ARNt y la translocación respectivamente.

La apramicina principalmente bloquea la translocación alargando significativamente el estado rotacional en donde el complejo 70S está esperando al EF-G.<sup>135</sup> Para ello, secuestra al sitio-A en una conformación desfavorable para el EF-G incrementando la barrera energética que el EF-G necesita sobrepasar para llevar a cabo la translocación. Por otro lado, la apramicina no induce la conformación de empuje de los nucleótidos A1492 y A1493 por lo que no produce errores en la monitorización de codón-anticodón.

La paromomicina y la gentamicina en cambio sí que producen errores en la decodificación ya que producen el movimiento de los nucleótidos A1492 y A1493 hacia fuera como se ha explicado anteriormente.<sup>140</sup> No obstante su mayor efecto es ralentizar tanto la rotación del ribosoma como la translocación, incrementando la barrera energética para que el ribosoma realice dichas acciones de manera que con el ribosoma atascado, el ARNt puede llegar a disociarse junto con la cadena peptídica (Figura 9).



**Figura 9. Disrupción de los aminoglucósidos en distintos pasos de la elongación.**<sup>139</sup> (A) Ciclo normal de elongación del ribosoma. La rotación ocurre rápidamente tras la formación del puente peptídico entre los ARNts de los sitios A y P. A continuación el EF-G transloca el ribosoma moviendo los ARNt al sitio P y E de manera que el ribosoma continúe con la elongación. (B) La apramicina bloquea la translocación. (C) La paromomicina y gentamicina inducen error en la decodificación además de ralentizar la rotación de la subunidad y la translocación.

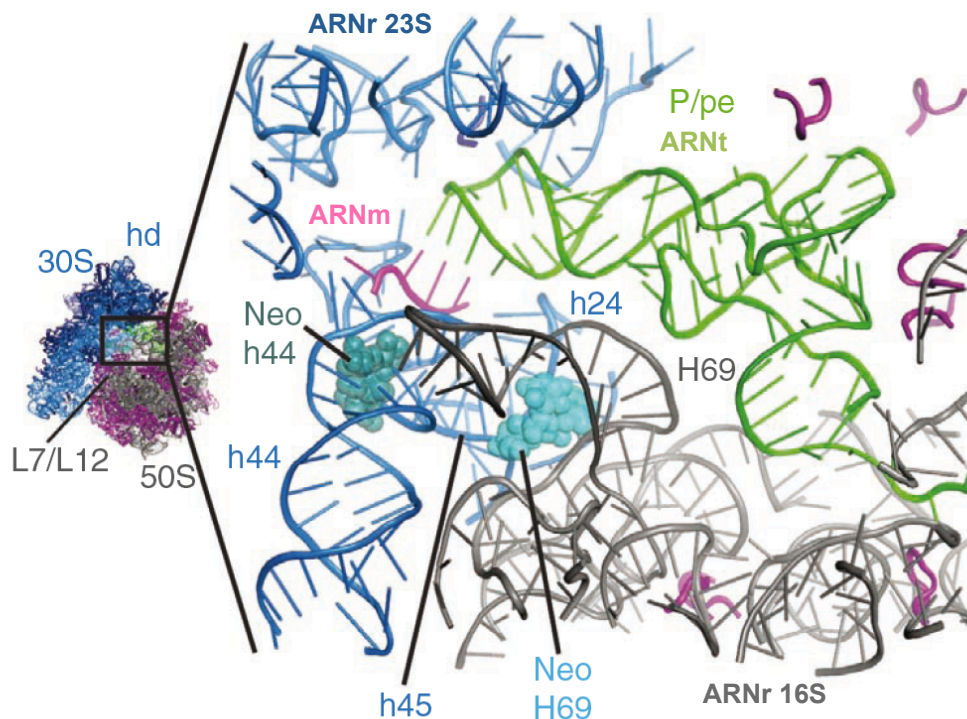
### 2.6.2. Diana en la hélice 69 del ARNr 23S.

Esta segunda diana de acción de los aminoglucósidos se localiza en la subunidad 50S, en la hélice 69 (H69) del ARNr 23S<sup>141,142</sup> (Figura 10). Es una región funcionalmente importante ya que la H69 interacciona con la H44 en la interfaz de las

dos subunidades formando el puente B2a.<sup>49</sup> Una vez terminada la traducción del ARNm,<sup>143</sup> el factor de reciclaje del ribosoma se une al puente y junto con el factor de elongación G disuelve dicho puente separando las dos subunidades y permitiendo de esta manera el reciclaje del ribosoma (Figura 2). La unión de los aminoglucósidos a la H69 estabiliza los contactos del puente e interfiere con el proceso de reciclaje del ribosoma.<sup>141,144</sup>

Un estudio estructural detallado muestra la unión de la neomicina B (4,5-2-DOS) y de la gentamicina (4,6-2-DOS) a la subunidad 50S. Éstas se van a unir al ARNr 23S en el surco mayor de la H69 en el lado 3' del tallo, en el punto de intersección con el giro terminal que incluye principalmente la unión a G1921, U1923 y G1906.<sup>124</sup>

En el caso de los 2-DOS, los anillos I y II deben jugar un papel en la unión de los aminoglucósidos a la H69 de la misma forma que para su unión a la hélice 44. La horquilla en la H69 está altamente conservada y modificada post-transcripcionalmente con pseudouridinas ( $\Psi$ ).

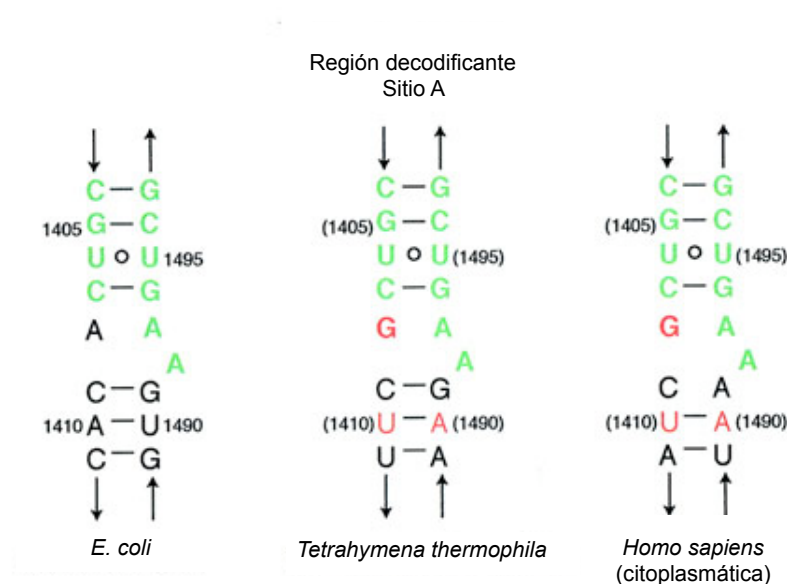


**Figura 10. Interacción de los aminoglucósidos con el ARNr 16S y 23S.**<sup>142</sup> Contactos de la neomicina (azul claro) con la H44 en el ARNr 16S (azul oscuro) y la H69 en el ARNr 23S (gris). El ARNt (verde) y el ARNm (rosa) también aparecen indicados.

### 2.6.3. Especificidad de unión en el ribosoma procariota.

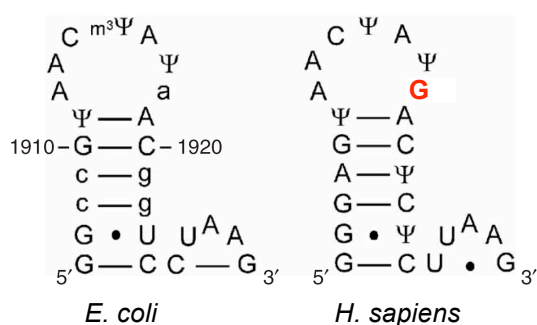
Los ribosomas procariotas y mitocondriales presentan una adenosina en la posición 1408 del ARNr 16S.<sup>145</sup> En cambio, los ribosomas citoplasmáticos eucariotas que son resistentes a la mayor parte de los aminoglucósidos<sup>146</sup> tienen una guanosina en la posición equivalente a 1408<sup>147</sup> (Figura 11).

Estudios bioquímicos y estructurales han demostrado la importancia del par de bases A1408•A1493 en la alta afinidad de la paromomicina por la región decodificante.<sup>44,148</sup> La geometría del par A•A va a crear un bolsillo de unión específico para el anillo I de los 2-DOS.<sup>44,149</sup> De esta manera, la expresión de un ARNr 16S que contiene una mutación de A1408 a G en los ribosomas de *E. coli*, confiere resistencia a muchos aminoglucósidos explicando así la acción específica de los mismos en procariotas.<sup>134</sup>



**Figura 11. Estructura secundaria de la H44 en la región decodificante del ARNr 16S de procariotas (*E. coli*) y eucariotas (*T. thermophila* y *H. sapiens*).**<sup>134</sup> Las secuencias están numeradas siguiendo la numeración de *E. coli*. Los nucleótidos que están conservados en todos los ribosomas, sin incluir los mitocondriales, aparecen en color verde. Los nucleótidos que están conservados en todas las células eucariotas están señalados en rojo. La G1408 señalada en rojo en el ribosoma eucariota se corresponde con una A en el ribosoma procariota

La horquilla de la H69 humana en el ARNr 23S también está modificada con tres  $\Psi$ s, pero la G3734 (según la numeración de *H. sapiens*) va a remplazar a la A1918 localizada en el giro de la H69 en *E. coli* (Figura 12). Esta diferencia en la H69 entre bacterias y humanos es comparable a la diferencia existente en la A1408 sustituida por una G en humanos en la H44 del ARNr 16S<sup>150</sup> que conlleva a una disminución de la afinidad de los aminoglucósidos por su diana.



**Figura 12. Estructura secundaria de la H69 en el ARNr 23S de bacterias (*E. coli*) y eucariotas (*H. sapiens*).<sup>141</sup>** En mayúsculas los nucleótidos con mas de un 95% de conservación con respecto a su reino. En minúscula las posiciones con un 88-95% de conservación. Las secuencias se corresponden con los nucleótidos 1906-1929 del ARNr 23S de *E. coli* y sus nucleótidos

equivalentes que van desde 3722-3745 en el ARNr 28S de *H. sapiens*. La G3734 señalada en rojo en el ribosoma de *H. sapiens* se corresponde con la A1918 en *E. coli*.

Aunque generalmente se ha hablado más de la diana en la H44, la diana en la H69 también ha ido cobrando importancia a lo largo de los últimos años.<sup>142</sup> Además, la proximidad física de estas dos dianas (Figura 10) sugiere la existencia de un acoplamiento funcional entre ambas de manera que las alteraciones en una de ellas también pudiera afectar a la unión de los aminoglucósidos en la otra.

## 2.7. Uso clínico.

Los aminoglucósidos se emplean fundamentalmente en el tratamiento de infecciones causadas por bacilos aerobios Gram-negativos, estafilococos y otros Gram-positivos<sup>128</sup> (Tabla 4). No obstante, cuando se usan frente a Gram-positivos se recomienda usarlos en combinación con otros antibióticos tales como  $\beta$ -lactámicos o vancomicina ya que ejercen un efecto sinérgico, probablemente por una mejora en la absorción.<sup>128,151</sup> Debido a la naturaleza de los aminoglucósidos, el mecanismo de

absorción de los mismos por parte de la bacteria requiere de la respiración por lo que las bacterias anaeróbicas son intrínsecamente resistentes<sup>152</sup> (Tabla 4).

**Tabla 4. Espectro de acción de los aminoglucósidos.**

Susceptibles	Naturalmente resistentes
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacteroides spp.</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Clostridium spp.</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Legionella spp.</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Mycoplasma spp.</i>
<i>Mycobacterium</i>	
<i>Alcaligenes spp.</i>	

Los principales aminoglucósidos disponibles para su uso en medicina pertenecen al grupo de los 2-DOS (indicados en la tabla 3). Algunos de ellos tales como amikacina, dibekacina, arbekacina, isepamicina y netilmicina son de origen semisintético y en un principio fueron diseñados con el fin de combatir a las bacterias resistentes a aminoglucósidos. Sin embargo, la gran variedad de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, el mecanismo de resistencia más extendido hasta la fecha, ha conseguido en su conjunto inactivar a la mayoría de los aminoglucósidos en uso. La arbekacina durante los años 90 se hizo muy popular en Japón al no ser sustrato de la gran mayoría de las enzimas modificadoras. Sin embargo la reciente adquisición por microorganismos patógenos de metiltransferasas del ARNr 16S, objeto de estudio de esta tesis, ha supuesto la obtención de un mecanismo que confiere altos niveles de resistencia a todos los aminoglucósidos en uso incluyendo a la arbekacina.

No obstante, aunque las nuevas generaciones de antibióticos han ido en cierta parte remplazando a los aminoglucósidos, a día de hoy, continúan siendo uno de los

mayores grupos de antibióticos de uso clínico según lo expuesto por la Organización Mundial de la Salud.<sup>153</sup>

### *2.7.1. Medicina humana: Pseudomonas aeruginosa y fibrosis quística.*

La estreptomicina, descubierta en 1943, fue el primer antibiótico eficaz contra la tuberculosis. Actualmente, la estreptomicina sigue en uso en terapias combinadas en el tratamiento de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>154</sup> y otros aminoglucósidos tales como amikacina o kanamicina se usan en el tratamiento de infecciones por *M. tuberculosis* resistentes.<sup>155</sup> También se emplean en el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, estreptococos y enterococos además de otras infecciones que suponen una amenaza para la vida como tularemia (*Francisella tularensis*), peste (*Yersinia pestis*), brucelosis (*Brucella sp.*) y endocarditis causada por enterococos.<sup>128</sup> La propiedad de los aminoglucósidos para disminuir la fidelidad de la maquinaria de elongación eucariota, los hace potentes candidatos para tratar mutaciones sin sentido relacionadas con desórdenes genéticos tales como la fibrosis quística, que además suele cursar con infecciones producidas por *Pseudomonas aeruginosa*,<sup>156</sup> y la distrofia muscular de Duchenne.<sup>157</sup> También se ha usado en el tratamiento de la enfermedad de Ménière mediante inyección intratimpánica.<sup>158,159</sup> Así mismo, se ha determinado que fármacos basados en aminoglucósidos son también inhibidores de la división del virus VIH, mostrando su potencial como tratamiento prometedor del SIDA.<sup>160</sup>

#### **- *Pseudomonas aeruginosa* y fibrosis quística.**

A continuación, se ha profundizado a cerca del empleo de los aminoglucósidos en el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, siendo especialmente relevante en pacientes que padecen fibrosis quística, ya que en este trabajo de tesis doctoral ha sido objeto de estudio la región de unión de los aminoglucósidos en el ribosoma de dicha especie bacteriana.

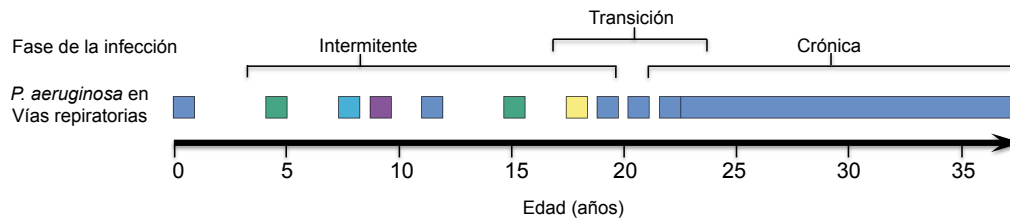
La tobramicina, un aminoglucósido aislado de la bacteria *Streptomyces tenebrarius*, es el tratamiento de elección en infecciones causadas por el patógeno



oportunista *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>161</sup> No obstante, algunos aislados clínicos han demostrado una resistencia inducible a tobramicina.<sup>162</sup> Debido a que tanto *P. aeruginosa* como *S. Tenebrarius* están presentes en el suelo,<sup>163</sup> Hoffman *et al.* han propuesto que *P. aeruginosa* ha desarrollado repuestas adaptativas antes del uso clínico de los antibióticos siendo uno de ellos la formación de biofilms resistentes a antibióticos.<sup>164</sup> Esta repuesta será por tanto ventajosa para *P. aeruginosa* tanto en el suelo cuando se encuentre con microorganismos productores como en hospedadores humanos que reciben terapia antibiótica en donde se van a encontrar con concentraciones variables del antibiótico.

El caso más destacado tiene lugar en infecciones de las vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística en donde *P. aeruginosa* alcanza una densidad de hasta  $10^9$  células viables en el esputo.<sup>165</sup> La fibrosis quística es un desorden hereditario cuya enfermedad clínica suele presentarse con una incidencia de 1 por cada 2500 nacimientos. Está causada por la presencia de una de las múltiples mutaciones posibles del gen regulador de la conductancia transmembranosa (CFTR) resultando en un transporte defectuoso del ion cloruro a través de las superficies epiteliales. Así, se disminuye el volumen del líquido periciliar en el tracto respiratorio inferior que va a interferir con el aclaramiento mucociliar de los microorganismos inhalados.<sup>166</sup> Como consecuencia va a haber un reclutamiento temprano de mediadores de la inflamación, incluyendo leucocitos polimorfonucleares y anticuerpos. En estos casos, la tobramicina es el tratamiento de elección frente a infecciones de *P. aeruginosa*, que se hace en modo de aerosol siendo éste el más efectivo y el que presenta menores efectos adversos. La administración se realiza dos veces al día en ciclos de 28 días aproximadamente. No obstante, es inevitable que una fracción de estas bacterias se vea expuesta a concentraciones subinhibitorias. Estudios han mostrado que más del 60% de pacientes con fibrosis quística van a estar infectados de forma crónica por esta bacteria alrededor de la edad de 20 años<sup>166</sup> (Figura 13). De esta manera, la terapia antibiótica con tobramicina prolonga la expectativa de vida de los pacientes reduciendo la intensidad de las infecciones, siendo el papel de este antibiótico una medida paliativa que raramente erradica este tipo de infecciones.<sup>167</sup> Este intensivo tratamiento antibiótico ha ampliado la media de expectativa de vida de forma drástica aunque se estima que los pacientes nacidos a principios del siglo XXI vivirán una media de 40 años.<sup>168</sup> La terapéutica de dichas infecciones sigue siendo un desafío a día

de hoy; sin embargo, los aminoglucósidos indiscutiblemente siguen manteniendo un papel muy importante en un futuro inmediato.<sup>169</sup>



**Figura 13. Representación esquemática de la progresión de una infección de *P. aeruginosa* en un paciente hipotético con fibrosis quística.**<sup>166</sup> Cada color representa un clon filogenéticamente independiente. Las infecciones intermitentes pueden erradicarse y los pacientes no son portadores durante varios años. Las últimas reinfecciones intermitentes pueden deberse a cepas de *P. aeruginosa* con diferente genotipo pero en un 25% de los casos la recolonización ocurre con el mismo genotipo.<sup>170,171</sup> La fuente de esta re-colonización podría deberse tanto a una fuente persistente en el ambiente o a un reservorio no detectado en el paciente.<sup>172</sup> El proceso se repite hasta que finalmente se establece la infección crónica.

### 2.7.2. Medicina veterinaria y vegetal.

En cuanto a la medicina veterinaria, el empleo de aminoglucósidos únicamente se permite a nivel clínico ya que en 2006 la Unión Europea prohibió el empleo de antibióticos como promotores de crecimiento. Los antibióticos aprobados, los periodos de supresión en animales destinados al consumo humano así como las vías de administración van a estar determinados en la normativa vigente de cada país. Cabe destacar que el uso de la apramicina se ha destinado únicamente a animales y no a medicina humana por lo que es un aminoglucósido especialmente relevante en medicina veterinaria que ha sido ampliamente utilizado desde los años 80. Además, excepto en gatos, es bastante seguro presentando unos niveles muy bajos de ototoxicidad.<sup>173</sup>

Los tratamientos varían según se trate de animales de producción o animales de compañía. En animales de producción los tratamientos son a nivel global de manera que a menudo se realizan mediante solución oral con neomicina o apramicina para el control de enteritis ocasionadas por *E. coli* y *Salmonella spp.* La administración vía oral en animales de producción limita en gran medida el empleo de los mismos en

infecciones sistémicas debido a su pobre absorción intestinal. En cambio, en perros y gatos cuyo tratamiento es a nivel individual, se suelen emplear inyecciones de amikacina y gentamicina para el tratamiento de infecciones respiratorias y del tracto urinario y en septicemias<sup>174</sup>.

Ciertos aminoglucósidos (señalados en la tabla 3) se emplean como antihelmínticos en animales como la hygromycina B y la destomicina A.<sup>175</sup> Otros como la kasugamicina se emplean para combatir enfermedades en plantas tales como las enfermedades producidas por hongos en los arrozales.<sup>176</sup>

## **2.8. Toxicidad de los aminoglucósidos y la mitocondria eucariota.**

Los aminoglucósidos son cationes altamente polares lo que hace que su metabolismo no sea fácil.<sup>177</sup> La filtración glomerular aclara rápidamente los aminoglucósidos de la mayoría de los tejidos y órganos.<sup>177,178</sup> No obstante, estos antibióticos pueden llegar a concentrarse en las células de los túbulos renales y en la perilinfa y endolinfa del oído interno.<sup>179</sup> Por tanto, su uso puede frecuentemente llevar a la toxicidad en torno al sistema renal, de audición y vestibular<sup>180</sup> lo cual limita las dosis a las que pueden utilizarse. La nefrotoxicidad es generalmente reversible y la presentación clínica más común es mediante insuficiencia renal aguda no oligúrica.<sup>181,182</sup> La ototoxicidad incluye pérdida en la audición neurosensorial severa, bilateral y permanente e hipofunción vestibular temporal.<sup>183</sup>

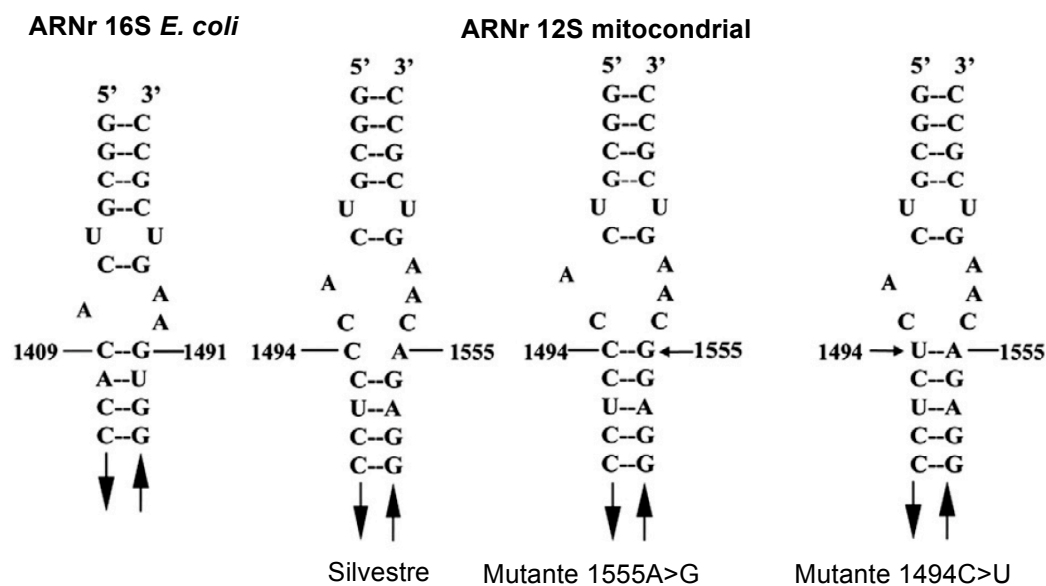
El estudio de su toxicidad permite diseñar nuevas pautas para su administración incluyendo el reconocimiento del paciente y monitorización del mismo así como la administración de una sola dosis al día.<sup>184</sup> De esta manera se reducen los riesgos de ototoxicidad y nefrotoxicidad permitiendo que estos antibióticos, cuya eficacia es muy alta, continúen siendo de gran valor para el tratamiento de infecciones.

### *2.8.1. Ototoxicidad*

La toxicidad vestibular y en la audición suele ser irreversible. Estos efectos secundarios suelen ser más agudos cuando los aminoglucósidos se prescriben sin una adecuada monitorización del paciente. El tipo, dosis, tiempo del tratamiento y edad también influyen en la severidad de las deficiencias auditivas. A las dosis más altas de administración, la mayoría de los individuos padecen efectos tóxicos. En cambio, algunos pacientes han desarrollado pérdida de audición inducida por aminoglucósidos tras el tratamiento con dosis convencionales o incluso con una dosis única durante un periodo corto. En estos casos la toxicidad puede tener una etiología genética o predisposición con dominancia autosómica o recesiva, patrones hereditarios asociados al cromosoma X o mitocondriales. En particular, en una proporción significativa la susceptibilidad a aminoglucósidos que induce pérdida de la audición se hereda por parte de la madre.<sup>180,185</sup>

La mitocondria tiene un origen bacteriano y como consecuencia los ribosomas mitocondriales comparten mayores similitudes con los ribosomas bacterianos que con los ribosomas citosólicos.<sup>186,187</sup> Por lo tanto, se ha sugerido como diana de aminoglucósidos la subunidad pequeña de los ribosomas mitocondriales.<sup>180,185</sup>

El ARNr mitocondrial 12S es un punto caliente de mutaciones asociadas con la sordera no sindrómica y sordera inducida por aminoglucósidos. Entre ellas, las mutaciones 1555>G y 1494C>A situadas en la región decodificante del ARNr 12S altamente conservada se han asociado por todo el mundo a la pérdida de audición en personas. Estas mutaciones formarán nuevos pares de bases 1494C-G1555 o 1494U-A1555 en la región del sitio-A del ARNr 12S altamente conservada (Figura 14).<sup>188</sup> Estas modificaciones hacen que los ribosomas mitocondriales humanos sean más parecidos a los bacterianos favoreciendo la unión de los aminoglucósidos. Como consecuencia, la exposición a los aminoglucósidos de individuos portadores de una de estas mutaciones puede inducir o empeorar la pérdida de audición. Es por ello que los pacientes que fueran positivos a estas mutaciones deberían ser informados del riesgo de ototoxicidad y evitar el uso de aminoglucósidos.



**Figura 14.** Estructura secundaria del sitio-A de unión a los aminoglucósidos en ARNr 16S de *E. coli* y su región correspondiente en el ARNr 12S mitocondrial humano.<sup>185</sup> Aparecen indicadas la versión silvestre y las versiones mutantes 1555A>G y 1494C>U mitocondriales.

Cabe destacar que la apramicina, que ha sido empleada únicamente en medicina veterinaria, ha mostrado una clara disociación entre su actividad frente al ribosoma bacteriano y mitocondrial siendo baja frente a éste segundo. A su vez, el potencial ototóxico de la apramicina ha resultado ser muy bajo.<sup>173</sup> Esta observación, además de reforzar el concepto de que los aminoglucósidos inducen un mal funcionamiento de los ribosomas mitocondriales, proporciona una base para la mejora racional del uso de antibióticos así como del diseño de nuevos antibióticos.

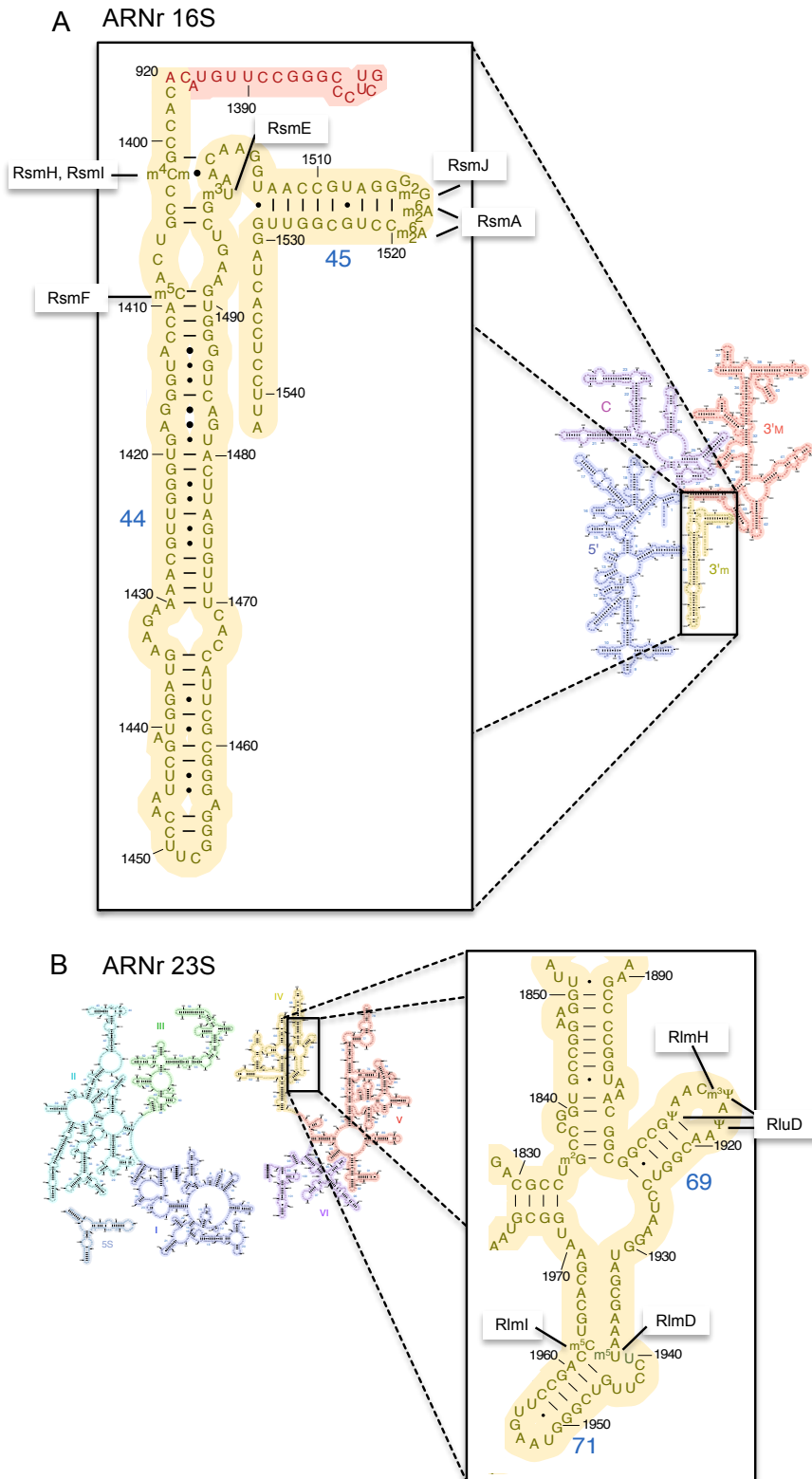
### 2.8.2. Nefrotoxicidad

A diferencia de la ototoxicidad, la nefrotoxicidad causada por los aminoglucósidos suele ser reversible. Producen nefropatía túbulo-intersticial como resultado de una potencial acumulación del compuesto al ser las concentraciones tóxicas muy cercanas a las concentraciones efectivas. El riesgo se incrementa con la combinación de otros medicamentos particularmente en pacientes debilitados y en tratamientos que duran más de 10 días. La frecuencia en la aparición de las deficiencias renales se estima de entre el 3 y el 25% de los pacientes tratados y la gentamicina ha resultado ser el aminoglucósido con mayor nefrotoxicidad. Para

producir nefrotoxicidad, del mismo modo que en la ototoxicidad, el aminoglucósido actúa a nivel de la mitocondria de la célula eucariota.<sup>189</sup> Por tanto, como hemos indicado anteriormente es imprescindible el diseño de una posología óptima a la hora de administrar este tipo de antibióticos para poder prevenir sus efectos tóxicos.

## **2.9. Modificaciones post-transcripcionales en las dianas de los aminoglucósidos.**

En el capítulo I se han señalado las modificaciones endógenas en los ARNr que han sido mapeadas y estudiadas en el ribosoma de *E. coli* y consisten en 11 modificaciones en nucleótidos del ARNr 16S y 25 del ARNr 23S (Tabla 2). Estas modificaciones son en su mayoría metilaciones de nucleósidos en la base o en el 2'-hidroxilo de la ribosa o pseudouridilaciones ( $\Psi$  5-ribosyl-uracyl). Las regiones diana de acción de los aminoglucósidos, en la H44 del ARNr 16S y en la H69 en el ARNr 23S así como regiones adyacentes, son regiones funcionales del ribosoma que presentan múltiples modificaciones post-transcripcionales (Figura 15). Este hecho refuerza la noción de que las modificaciones post-transcripcionales tienden a ocurrir en regiones del ARNr que son de vital importancia,<sup>190,191</sup> muchas de ellas conservadas entre organismos.



**Figura 15. Modificaciones post-transcripcionales del ARNr en el sitio de acción de los aminoglucósidos en *E. coli*.** Estructura secundaria del ARNr de *E. coli* en donde aparecen resaltadas las regiones de unión a los aminoglucósidos y regiones adyacentes con sus respectivas metilaciones endógenas en el ARNr 16S (A) y 23S (B).

2.9.1. *Modificaciones endógenas postranscripcionales en la H44 y región adyacente del ARNr 16S de Escherichia coli.*

La H44 del ARNr 16S presenta modificaciones en **m<sup>4</sup>Cm1402** que están mediadas por las enzimas **RsmH** y **RsmI**.<sup>82</sup> La más estudiada de las dos enzimas ha sido RsmH que lleva a cabo la metilación m<sup>4</sup>C1402. Se trata de un dímero que se une exclusivamente a la subunidad 30S e interactúa con el codón del ARNm en el sitio-P incrementando la fidelidad de la traducción. Se ha comprobado la presencia de homólogos de RsmH y RsmI en todas las especies bacterianas. Adicionalmente, RsmH está en plantas y vertebrados mientras que RsmI solamente está presente en algunas plantas.<sup>82</sup>

También está presente la modificación en **m<sup>5</sup>C1407** mediada por **RsmF**<sup>83</sup> cuyo dominio catalítico (SAM- *binding catalytic domain*) se parece al de RsmB, otra metilasa m<sup>5</sup>C del ARNr 16S que metila la posición m<sup>5</sup>C967. Sus dominios PUA y SAM-mtase<sup>IV</sup> van a hacer contacto con el ARNr 16S y la proteína ribosómica S12.<sup>192</sup> Para que la citosina que va a ser modificada alcance el sitio activo de la metilasa, esta primera debe cambiar su conformación. Este comportamiento refleja el de las enzimas más primitivas las cuales no habían adquirido la suficiente competencia como para realizar su proceso catalítico correspondiente de manera que requerirían del soporte de moléculas de ARN.

Por último en la H44 se localiza la metilación en **m<sup>3</sup>U1498** mediada por **RsmE**.<sup>193</sup> Ésta forma un dímero que se une a la subunidad 30S y juega un rol en la comunicación entre subunidades. También tiene un dominio PUA-like.

En cuanto al bucle de la H45 en el extremo 3' del ARNr 16S, en él están presentes las modificaciones en **m<sup>6</sup>m<sup>2</sup>A1518** y **m<sup>6</sup>m<sup>2</sup>A1519** mediadas por la enzima **RsmA**, mas conocida como **KsgA**,<sup>86</sup> que son las únicas presentes en el último ancestro común entre procariotas y eucariotas y por tanto muy conservadas desde bacterias a humanos. Esta enzima presenta su homóloga en arqueas y eucariotas, que se denomina Dim1. La inactivación de RsmA va a conferir resistencia al aminoglucósido

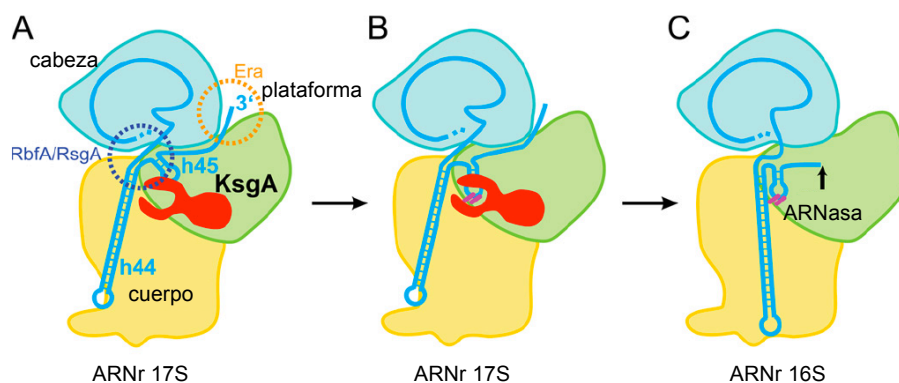
---

<sup>IV</sup> Como se indicó en el capítulo 1, las metiltransferasas se caracterizan por tener un dominio SAM-mtase. Se trata de un dominio catalítico responsable de la unión a la molécula AdoMet y el proceso catalítico. El dominio PUA que tienen algunas es responsable del reconocimiento del sustrato (ARNr y el complejo r-proteína).



kasugamicina. Su conservación tan extensa así como su localización próxima al centro funcional de la subunidad pequeña implica que presenta una función celular importante. RsmA va a reconocer a la subunidad 30S madura sirviendo a modo de marcador de las subunidades 30S competentes<sup>72</sup>. De esta manera, RsmA va a asegurar que los pasos finales del procesamiento del ARNr se retrasen hasta que no se haya formado un 30S intermedio ensamblado apropiadamente. Cuando la subunidad alcanza un cierto grado de madurez, RsmA, que se había unido previamente a la subunidad 30S bloqueando la región decodificante, metila la hélice 45 y se disocia. Se producen entonces reajustes conformacionales en la hélice 44 y de esta manera finaliza el proceso de maduración de la subunidad (Figura 16). En el caso de esta enzima vemos la estrecha relación entre modificación del ARNr y funcionalidad ribosomal.<sup>194</sup>

Por último, en este mismo bucle de la H45 se localiza la metilación en **m<sup>3</sup>G1516** llevada a cabo por la enzima **RsmJ**.<sup>85</sup>



**Figura 16. Ilustración esquemática de los cambios conformacionales del ARNr de la subunidad 30S controlados por KsgA.**<sup>194</sup> La subunidad 30S aparece formada por el cuerpo (dominio 5'), plataforma (dominio central) y la cabeza (dominio 3'). Los cambios conformacionales de la H44 y la H55 aparecen en azul. KsgA aparece en rojo y los sitios de unión de las GTPasas RbfA/RsgA y Era aparecen indicados con círculos azul y naranja respectivamente. Las bases metiladas aparecen en magenta. La flecha indica el lugar en el que se produce el corte del ARNr 17S seguido de la disociación de KsgA.

2.9.2. *Modificaciones endógenas post-transcripcionales en la H69 y región adyacente del ARNr 23S de Escherichia coli.*

En la región de unión de los aminoglucósidos en la H69 hay tres pseudouridilaciones ( $\Psi$ ) llevadas a cabo por la **RluD** sintasa que convierte a todos los uracilos en dicha región.<sup>91,94</sup> Estas son  $\Psi$ 1911,  $\Psi$ 1915 y  $\Psi$ 1917 situadas en el bucle de la H69. No hay más uracilos próximos. El más cercano estaría seis residuos más lejos de U1917. RluD presenta una especificidad para UA análoga a la especificidad de RluC, otra uridil-sintasa, que presenta especificidad por UG.

Posteriormente, **RlmH** metila a  $\Psi$ 1915 en la posición N3 dando lugar al residuo **m<sup>3</sup> $\Psi$ 1915**.<sup>95,96</sup> RlmH es una metilasa de tamaño muy pequeño que forma un dímero que se une al ARNr 16S y a la proteína-r S12. No interfiere con el ARNt en el sitio-P pero sí con el ARNt en el sitio-A por lo que el momento de metilación tiene lugar en el complejo de iniciación ribosoma con Fmet-ARNt en el sitio-P. Es el único nucleótido pseudouridilado y después metilado. La metilación y la pseudouridilación tienen efectos opuestos ya que la metilación limita la aproximación a otros componentes mientras que la pseudouridilación gana un sitio extra para una interacción electrostática. En todas las especies que está RlmH presente hay una pseudouridina en posición  $\Psi$ 1915 pero no en todas las que está  $\Psi$ 1915 está RlmH. En eucariotas dicha metilación va a estar siempre ausente.

En las regiones adyacentes a la H69 se localizan las metilaciones **RlmD** que metila **m<sup>5</sup>U1939**<sup>89,97</sup> y **RlmI** que metila **m<sup>5</sup>C1962**.<sup>98</sup> RlmI tiene un dominio PUA aunque no resulta parecido al de RsmF. Ambas se unen al ARN desnudo, es decir, al 23S necesitando que éste adopte una conformación especial.

RlmD es en concreto una enzima muy primitiva existiendo homólogos en eucariotas. La metilación de esta enzima probablemente module la unión del ARNt o ARNtm<sup>V</sup> ya que la secuencia del ARN de 1934-1949 parece ser complementaria en el dominio ARNt-like del ARNtm.<sup>196</sup>

---

<sup>V</sup> El ARNtm tiene propiedades del ARNt y del ARNm. Forma un complejo con la proteína pequeña B (SmpB), el factor de elongación Tu (EF-TU) y la proteína ribosomal S1. El ARNtm y sus proteínas asociadas se unen a los ribosomas bacterianos que se han atascado en mitad de la síntesis de proteínas; por ejemplo cuando el ARNm ha perdido su codón-stop. Recicla el ribosoma, añade una señal inductora

### 2.9.3. Modificaciones que confieren resistencia a aminoglucósidos.

Además de las modificaciones endógenas señaladas en los dos apartados anteriores, existen otras metiltransferasas que metilan la H44 del ARNr 16S confiriendo resistencia a aminoglucósidos. Entre ellas se encuentra la modificación intrínseca en *Enterococcus faecium* mediada por EfmM en m<sup>5</sup>C1404.<sup>197</sup> A su vez son de mayor relevancia, y objeto de estudio de esta tesis, las modificaciones adquiridas en m<sup>7</sup>G1405 mediada por ArmA y RmtA-H<sup>198-201</sup> y la metilación en m<sup>1</sup>A1408 mediada por NpmA que confieren altos niveles de resistencia a aminoglucósidos.<sup>198</sup> Dichas modificaciones tienen una mayor prevalencia en patógenos clínicos y a su vez muestran similitud con enzimas que originalmente se han identificado en actinomicetos ambientales de los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora* productores de aminoglucósidos<sup>VI</sup>.

---

de proteólisis al polipéptido inacabado y facilita la degradación del ARNm aberrante<sup>195</sup> Keiler, K. C. Biology of trans-translation. *Annu Rev Microbiol* **62**, 133-151, (2008).

<sup>VI</sup> Las modificaciones m<sup>7</sup>G1405 y m<sup>1</sup>A1408 se desarrollan de manera extensa en el capítulo 3, destinado a mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos.

### CAPÍTULO III. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS AMINOGLUCÓSIDOS: LAS METILASAS DEL ARN<sup>r</sup> DEL 16S.

#### 3.1. La resistencia a antibióticos.

A partir del descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming,<sup>110</sup> los antibióticos consiguieron hacer frente a lo que en su día fueron grandes plagas de la humanidad, como la tuberculosis o la lepra, además de curar enfermedades venéreas y pulmonares. Así mismo, infecciones que suponían un riesgo para la vida de las personas se abordaron de manera rápida y eficaz. Los antibióticos en definitiva supusieron un antes y un después en la historia de la medicina. Por otra parte, sin ser conscientes de las implicaciones, durante muchos años los antibióticos se han empleado de forma masiva tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. De esta forma, las bacterias han demostrado una enorme evolvabilidad hacia la resistencia a antibióticos. Esto, sumado a los mecanismos de adquisición y transferencia de resistencias, ha empeorado de forma alarmante el panorama actual en cuanto a bacterias resistentes a antibióticos y la eficacia de los mismos. La rápida emergencia y diseminación de mecanismos de resistencia frente a todos los antibióticos disponibles para su uso clínico, sumado a la escasez en el descubrimiento o síntesis de nuevos antibióticos en los últimos años ha dado lugar a que la resistencia a antibióticos suponga a día de hoy un gran reto para la medicina.<sup>202</sup> En la actualidad, los antibióticos siguen siendo indispensables en intervenciones médicas incluyendo aquellas relacionadas con el trasplante de órganos y la quimioterapia frente al cáncer o el SIDA. Sin embargo, la resistencia a antibióticos es ya un problema que se ha extendido tanto en infecciones nosocomiales como en la propia comunidad. De hecho la resistencia a antibióticos causa 15 veces más muertes directas que el propio SIDA en Europa. Es por esto que la lucha frente a la resistencia a antibióticos está clasificada dentro de los seis primeros temas principales a tratar en materia de salud en el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (*European Centre for Disease and Control*). Para ello, se han adoptado medidas basándose principalmente en una política de uso responsable y así mismo se han lanzado campañas para la concienciación ciudadana en cuanto a la necesidad de preservar la eficacia de los antimicrobianos<sup>203</sup> (Figura 17).

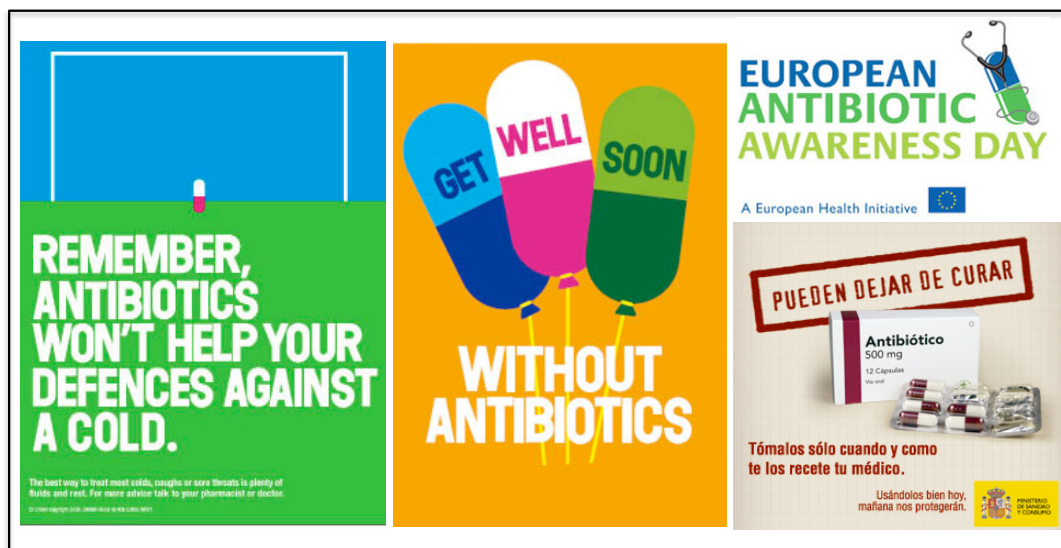


Figura 17. Campañas para el uso responsable de antibióticos de la Unión Europea y del Ministerio de Sanidad y Consumo de España.

### 3.2. Resistencia a los aminoglucósidos.

Los mecanismos generales que confieren resistencia a los aminoglucósidos se explican a lo largo de este capítulo y consisten básicamente en la disminución de la concentración intracelular del antibiótico, modificación enzimática del mismo o modificación de su diana de unión (Figura 18).

#### 3.2.1. Modificación de la concentración intracelular.

##### 3.2.1.1. Reducción en la entrada.

El sistema PhoP-PhoQ es un sistema de dos componentes en Gram-negativas que interviene en la regulación de genes involucrados en la modificación de los lipopolisacáridos de la membrana externa, cargados negativamente.<sup>204</sup> Cambios en dichos lipopolisacáridos pueden dar lugar a una reducción de la carga negativa neta disminuyendo las interacciones electrostáticas con los aminoglucósidos, cargados positivamente, en la primera etapa de absorción. Este mecanismo se ha observado en *P. aeruginosa*.

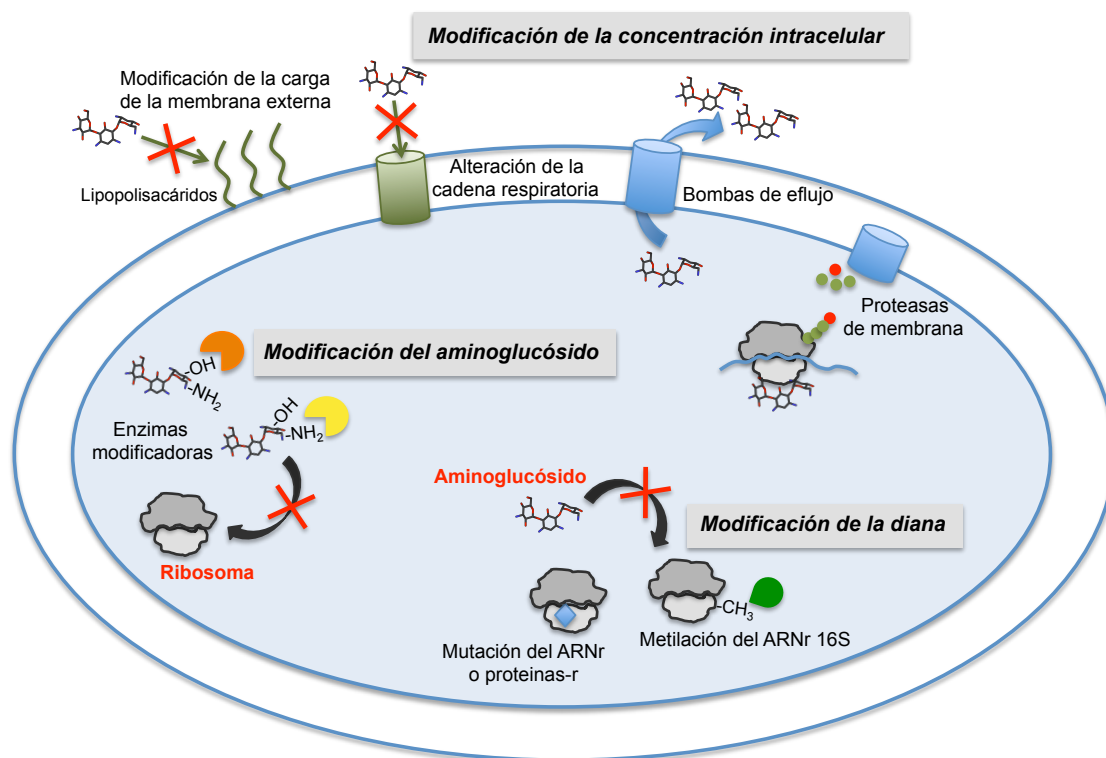


Figura 18. Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos.

En cuanto al transporte de los aminoglucósidos a través de la membrana, éste requiere de energía que involucra a la fuerza protón-motriz. Por tanto, cualquier mutación que de lugar a un defecto en el transporte de la cadena de electrones va a conferir resistencia. Recientemente se ha determinado que el óxido nítrico reprime la actividad respiratoria en *Salmonella*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*<sup>205</sup> así como en *Bacillus*.<sup>206</sup> Al estar el óxido nítrico asociado a las respuestas inflamatorias esto puede dar lugar a una disminución de la efectividad de los aminoglucósidos.

Por otra parte, dado que las bacterias anaerobias carecen de mecanismos dependientes del transporte de electrones así como de potencial de membrana, generalmente éstos son resistentes a los aminoglucósidos.

### 3.2.1.2. Bombas de eflujo.

Aunque en un principio se pensó que la naturaleza polar de los aminoglucósidos no se vería afectada por las bombas de eflujo; a día de hoy, están reconocidas como un mecanismo de resistencia general que afecta a diferentes compuestos incluyendo a los aminoglucósidos. Dentro de las familias de bombas capaces de extruir

aminoglucósidos, la familia RND (Resistant Nodular Division) es la más frecuente, la cual se encuentra principalmente en Gram-negativas.<sup>207</sup> Su acción contribuye a las resistencia en *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Helicobacter* y *Stenotrophomonas spp.*<sup>208</sup> También se han visto implicadas en la resistencia a aminoglucósidos bombas de eflujo MFS (Major Facilitator Superfamily) en *A. baumannii*<sup>209</sup> y en *V. cholera*.<sup>210</sup> Así mismo, existe evidencia de la actividad de la MFS en algunas cepas de *M. tuberculosis* para explicar la resistencia a estreptomicina.<sup>211</sup>

No obstante, la resistencia a aminoglucósidos mediada por bombas es modesta y parece jugar un papel más importante únicamente en la resistencia adaptativa en *P. aeruginosa*.<sup>212</sup> Esto se debe a que otros mecanismos de resistencia más específicos se imponen ante las bombas de eflujo ya que estos primeros suponen un menor coste para la bacteria.<sup>208</sup>

### 3.2.1.3. Proteasas de membrana.

Las proteasas de membrana no conllevan a una disminución de la concentración de los aminoglucósidos propiamente dicha pero su actividad disminuye la efectividad de los mismos en el interior celular. Participan en el control de la síntesis de proteínas mediante la degradación de proteínas defectuosas.<sup>213</sup> Dichas proteasas son por tanto responsables de la proteólisis de las proteínas mal traducidas debido a la presencia de aminoglucósidos. La integridad de la membrana se podrá perturbar si los niveles de proteínas defectuosas son mayores que la capacidad que tienen las proteasas para identificar y degradar dichas proteínas. En *E. coli* los genes *hflK* y *hflC* son reguladores de la proteasa de membrana FtsH. La delección de dichos genes da lugar a un incremento de la susceptibilidad a gentamicina en comparación a la cepa silvestre. Esto demuestra la importancia de la proteasa FtsH para la supervivencia de la bacteria en presencia a aminoglucósidos.<sup>214</sup> También se ha observado que dicha proteasa participa en la resistencia intrínseca a los aminoglucósidos en *P. aeruginosa* ya que al inactivar genes relacionados con FtsH y su regulación se consigue incrementar hasta 500 veces la sensibilidad a tobramicina.<sup>215</sup>

### *3.2.2. Modificación enzimática de los aminoglucósidos.*

Dentro de los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos conocidos, como se ha señalado anteriormente, las enzimas modificadoras de aminoglucósidos han sido hasta ahora las mas prevalentes en bacterias clínicas tanto Gram-negativas como Gram-positivas. Las enzimas modificadoras catalizan la modificación de diferentes grupos -OH o -NH<sub>2</sub> del núcleo 2-deoxystreptamino o los azúcares. Se clasifican en acetiltransferasas (AACs), nucleotidiltransferasas (ANTs) y fosfotransferasas (APHs) (Figura 19). El número de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, hospedadores y entornos genéticos identificados hasta la fecha es muy grande. La mutagénesis lleva a una continua aparición de nuevas variantes de enzimas modificadoras que utilizan a los aminoglucósidos como sustratos. Esto sumado a la transferencia horizontal de estos genes formando parte de integrones y/o transposones localizados frecuentemente en plásmidos conjugativos ha aumentado considerablemente la diseminación de dicho mecanismo de resistencia.<sup>216</sup>

#### *3.2.2.1. Nomenclatura.*

Actualmente hay dos nomenclaturas principales en uso para identificar a las enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

Una de ellas consiste en un identificador de la actividad formado por tres letras seguido del sitio de la modificación entre paréntesis (indicando la clase), un número romano particular indicativo del perfil de resistencia que confiere a las células hospedadoras (indicando la subclase) y una letra minúscula (indicador individual).<sup>217</sup> El paréntesis y la subclase generalmente están separadas por un guión pero posteriormente algunos autores lo han suprimido.<sup>218</sup>

En el otro sistema de nomenclatura los genes son designados *aac*, *aad* y *aph* seguidos de una letra mayúscula que identifica el sitio de modificación.<sup>219</sup> De este modo, *aacA*, *aacB*, y *aacC* se corresponden con 6'-N- acetiltransferasa, 2'-N-acetiltransferasa y 3-N-acetiltransferasa respectivamente. A continuación se añade un gen para proveer un identificador a los diferentes genes.



Cada nomenclatura tiene sus ventajas e inconvenientes y cada autor tiene sus preferencias pero como ya se ha sugerido anteriormente<sup>220,221</sup> sería conveniente llegar a un consenso de manera que sólo se emplee una de ellas con el fin de evitar la confusión, duplicaciones y facilitar posteriores avances en el campo.

#### 3.2.2.2. Aminoglucósido N-acetiltransferasas (AACs).

Las AACs pertenecen a la superfamilia de proteínas *N*-acetiltransferasas GNC5 relacionadas (GNAT), que incluye unas 10,000 proteínas.<sup>222</sup> Las enzimas GNAT catalizan la acetilación de los grupos  $-NH_2$  en la molécula aceptora empleando acetilcoenzima-A como un sustrato donador siendo, en el caso de las AACs, el aminoglucósido la molécula aceptora.

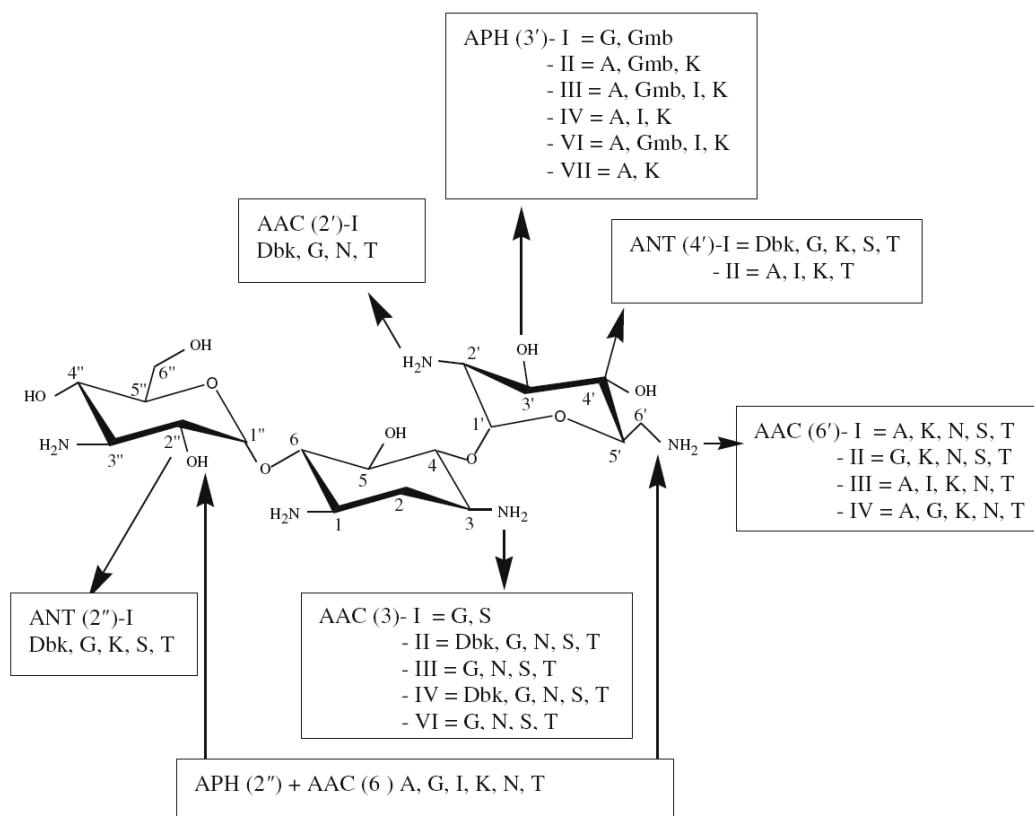
Las AACs catalizan la acetilación en las posiciones 1 [AAC(1)], 3 [AAC(3)], 2' [AAC(2')] o 6' [AAC(6')]. Se han resuelto estructuras tridimensionales y se han estudiado aspectos estructurales y funcionales de diversas acetiltransferasas.<sup>160,220,222-224</sup>

#### 3.2.2.3. Aminoglucósido O-nucleotidiltransferasas (ANTs).

Las ANTs median la inactivación de los aminoglucósidos catalizando la transferencia de un grupo AMP de un sustrato donador ATP a un grupo hidroxilo en la molécula de aminoglucósido. Hay cinco clases de ANTs que catalizan la adenilación en las posiciones 6 [ANT(6)], 9 [ANT(9)], 4' [ANT(4')], 2'' [ANT(2'')] y 3'' [ANT(3'')] de las cuales ANT(4') incluye dos subclases, I y II.

#### 3.2.2.4. Aminoglucósido O-fosfotransferasas (APHs).

Las APHs catalizan la transferencia de un grupo fosfato a una molécula de aminoglucósido.<sup>225</sup> Las clases y subclases son: APH(4)-I, APH(6)-I, APH(9)-I, APH(3')-I a VII, APH(2'')-I a IV, APH(3'')-I y APH(7'')-I.



**Figura 19. Molécula de kanamicina B con las diferentes enzimas modificadoras que actúan sobre ella.**<sup>226</sup> Los principales aminoglucósidos de uso clínico sobre los que actúan las diferentes enzimas: amikacina (A), dibekacina (Dbk), gentamicina (G), gentamicina B (Gmb), kanamicina A (K), isepamicina (I), netilmicina (N), sisomicina (S) y tobramicina (T).

### 3.2.3. Modificación de la diana.

La modificación de la diana puede ocurrir tanto por mutación de la misma en el ARNr o proteínas ribosomales<sup>227</sup> como por modificación post-transcripcional mediante metilación del ARNr 16S.<sup>198</sup>

#### 3.2.3.1. Mutación de la diana.

Las mutaciones directamente en la región decodificante en el ARNr 16S no son muy frecuentes. Dicha región está altamente conservada y la mayoría de las mutaciones en esta región son letales.

El ejemplo prototipo de una mutación exitosa en el sitio de unión en la subunidad 30S del ribosoma es la mutación en A1408 que confiere resistencia, tanto a los 4,5-2-DOS (neomicina) como a los 4,6-2-DOS (gentamicinas y kanamicinas), al interrumpir una interacción clave de los aminoglucósidos con su diana.<sup>228</sup>

En cuanto a mutaciones a nivel de proteínas ribosomales las más comunes son las originadas en S12. La estreptomicina interacciona con la proteína-r S12 por lo que mutaciones en dicha proteína pueden afectar a su unión con la estreptomicina confiriendo resistencia frente a la misma. Esto ocurre en *Mycobacterium tuberculosis* en donde mutaciones en el ARNr 16S y en la proteína S12 dan lugar a altos niveles de resistencia.<sup>229,230</sup> El caso de *M. tuberculosis* es el que tiene mayor relevancia a nivel clínico. Esto se debe a que al ser *Mycobacterium* el único género en Eubacteria con una única copia del operón ribosomal, una simple mutación da lugar a un fenotipo de alto nivel de resistencia.

### 3.2.3.2. Metilaciones post-transcripcionales del ARNr 16S.

La metilación del ARNr 16S es un mecanismo post-transcripcional que confiere altos niveles de resistencia frente a los aminoglucósidos y objeto de estudio de esta tesis doctoral. Dicho mecanismo se encuentra en la mayoría de microorganismos productores de aminoglucósidos a modo de autoprotección. A su vez, este mecanismo de resistencia ha sido adquirido por bacterias patógenas siendo un mecanismo emergente que ha cobrado una gran relevancia en los últimos años a nivel clínico. Dicho mecanismo será explicado ampliamente a lo largo de este capítulo.

Aunque el término más correcto para hacer referencia a estas enzimas es el de metiltransferasa, emplearemos indistintamente metilasa y metiltransferasa.

### 3.3. Metiltransferasas del ARNr 16S que confieren altos niveles de resistencia a aminoglucósidos.

#### 3.3.1. Metiltransferasas intrínsecas en bacterias productoras de aminoglucósidos.

Los actinomicetos son microorganismos Gram-positivos saprofitos que habitan en el suelo. Muchos de ellos pertenecen principalmente a los géneros *Streptomyces spp.* y *Micromonospora spp.*<sup>231,232</sup> y producen aminoglucósidos de manera natural. A su vez, estos microorganismos productores de aminoglucósidos han desarrollado estrategias para prevenir su autointoxicación. Uno de los mecanismos más comunes de resistencia es la protección de sus propios ribosomas mediante la metilación de la diana de unión a los aminoglucósidos en el ARNr 16S confiriendo altos niveles de resistencia frente a los mismos.<sup>233</sup>

##### 3.3.1.1. Clasificación en familias Kgm y Kam.

Las metiltransferasas que confieren resistencia a aminoglucósidos en las bacterias productoras de esta clase de antibióticos se clasifican en dos familias denominadas Kgm y Kam basándose en el nucleótido en el que producen la modificación, G1405 o A1408 respectivamente<sup>234-237</sup> (Figura 20).

La familia Kgm (kanamycin gentamicin methyltransferase) metila concretamente la posición m<sup>7</sup>G1405 y con ello confiere un alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos 4,6-2-DOS que incluyen gentamicina, kanamicina y tobramicina, con niveles por encima de 1000mg/μl. Sin embargo, la bacteria sigue siendo susceptible a la apramicina y a los 4,5-2-DOS como la neomicina.

El anillo III de los 4,6-2-DOS forma un puente de hidrógeno con la posición N7-G1405 mientras que la localización espacial de los anillos III y IV de los 4,5-2-DOS está lejos de dicha posición (Figura 21). Es por tanto que la modificación en N7-G1405 tiene un efecto en la interacción con los 4,6 y no los 4,5-2-DOS. La introducción de un grupo metilo en dicha posición interfiere directamente con la unión

al antibiótico induciendo un impedimento estérico entre la base modificada y el anillo III así como posibles repulsiones electrostáticas derivadas de la carga positiva en la base modificada.<sup>238</sup>

Por otro lado, la familia Kam (kanamycin-apramycin methyltransferase) metila la posición m<sup>1</sup>A1408 confiriendo alto nivel de resistencia, por encima de 1000mg/μl, a apramicina y a neomicina así como dentro de los 4,6-2-DOS a kanamicina, siendo el nivel de resistencia a gentamicina mucho menor.<sup>239</sup>

El anillo I de los aminoglucósidos, cuya estructura es común en los 2-DOS, contacta con la posición N1-A1408 y de esta manera la metilación de esta posición confiere resistencia tanto a los 4,5-2-DOS, a la apramicina y a los 4,6-2-DOS (Figura 21), aunque a gentamicina en menor medida.<sup>238</sup>

### 3.3.2. Metiltransferasas adquiridas en bacterias patógenas.

La metilación del ARNr 16S ha emergido recientemente como mecanismo de resistencia frente a aminoglucósidos en patógenos Gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y microorganismos no fermentativos de la glucosa como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* Su presencia confiere altos niveles de resistencia a todos los aminoglucósidos de uso clínico actual. Este evento está mediado por un grupo de metiltransferasas que comparten una cierta similitud con las mencionadas anteriormente presentes de manera intrínseca en actinomicetos ambientales productores de aminoglucósidos.

#### 3.3.2.1. Clasificación en familias Arm y Pam.

Las metilasas adquiridas en patógenos se han clasificado también en dos familias siguiendo el mismo criterio que las metilasas de bacterias productoras de aminoglucósidos. Se denominan Arm y Pam, según metilen G1405 o A1408<sup>238</sup> respectivamente (Figura 20).

Se han identificado en bacterias patógenas nueve genes, *armA*, *rmtA-H* y las variantes *rmtB2* y *rmtD2*, que codifican para metilasas clasificadas dentro de la familia Arm (Aminoglycoside Resistance Methyltransferase) las cuales metilan el residuo N7 en G1405.<sup>198-201</sup> Esta familia ha sido estudiada a fondo a lo largo de este trabajo de tesis.

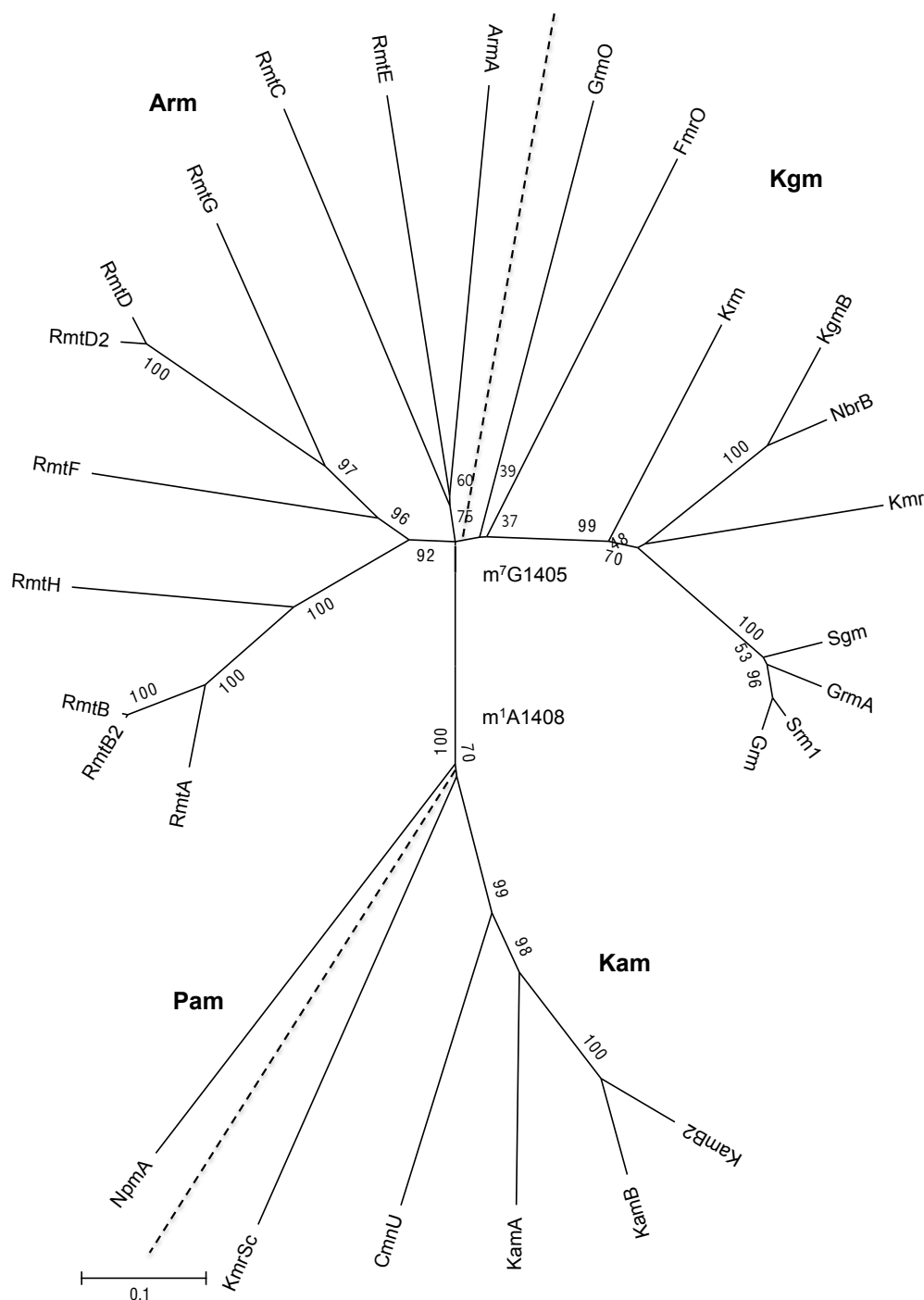
Tan sólo se ha identificado un gen, *npmA*, cuya enzima correspondiente se encuentra incluida dentro de la familia Pam (Pan-Aminoglucoside resistance Methyltransferase) que metila el residuo N1 en A1408.<sup>240</sup>

En principio estas enzimas se han asociado, a un grupo o a otro, de acuerdo a su fenotipo de resistencia y a su similitud con las metiltransferasas intrínsecas caracterizadas previamente en los actinomicetos. La mayoría de las metilasas adquiridas, forman parte de elementos genéticos móviles como transposones mediados por plásmidos lo cual potencia su capacidad de diseminarse entre especies también pudiéndose insertar en el cromosoma.

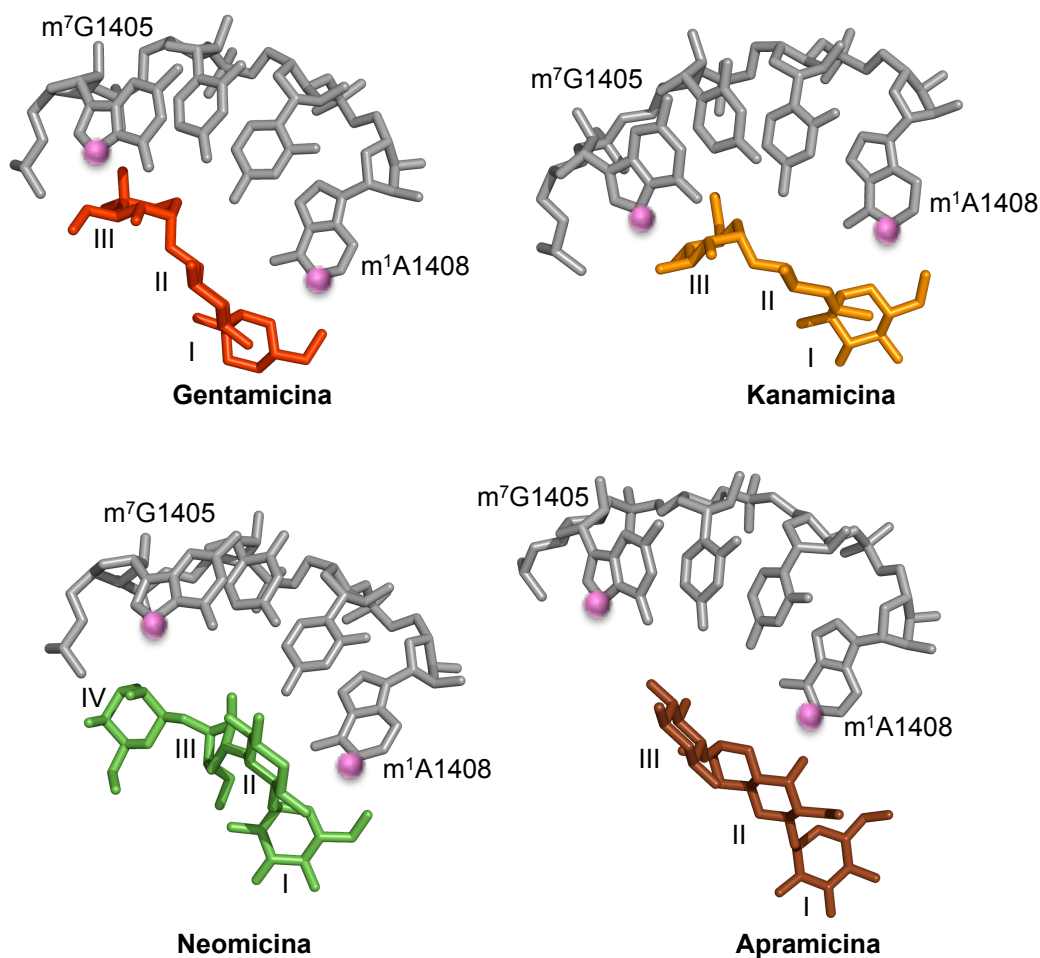
#### 3.3.2.2. Función enzimática.

Las once metilasas, *ArmA* y *RmtA-H*, confieren resistencia a los aminoglucósidos pertenecientes al grupo de los 4,6-2-DOS tales como amikacina, tobramicina y gentamicina. La función enzimática de *ArmA*, *RmtB* y *RmtC* ha sido caracterizada *in vitro* con proteínas purificadas demostrando que la adición del grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM) tiene lugar en la subunidad ribosomal 30S madura, formada por el ARNr 16S y proteínas ribosomales, y no sobre el ARNr 16S desnudo. Así mismo, mediante extensión de cebador se ha confirmado que estas tres metiltransferasas introducen un grupo metilo en la posición N7 de G1405.<sup>241-243</sup> Esto quiere decir que la estructura terciaria de la subunidad es necesaria para el reconocimiento y modificación de la diana por parte de la enzima.

Así mismo, NpmA también ha mostrado preferencia por la subunidad madura 30S y mediante extensión por primer se ha demostrado que metila la posición N1 de A1408 en el ARNr 16S.<sup>240</sup>



**Figura 20. Dendrograma de las metilasas del ARNr 16S que confieren resistencia a aminoglucósidos.** Familias Arm y Kgm que metilan m<sup>7</sup>G1405 y familias Pam y Kam que metilan m<sup>1</sup>A1408. La línea de puntos marca el límite entre familias. Dendrograma construido a partir del alineamiento de las diferentes proteínas con el programa MEGA 5.05, empleando el agrupamiento del vecino más cercano (*neighbour-joining grouping*) con 5000 réplicas.



**Figura 21. Estructura tridimensional de las interacciones de diferentes aminoglucósidos con los nucleótidos G1405 y A1408 en el ARNr 16S.** La esferas (rosa) simbolizan los grupos metilo. Figura realizada con el MacPyMOL (Schrödinger, LLC). Los códigos de acceso del PDB a partir de los cuales se han trabajado las figuras son 2ET3, 2ESI, 2ET4 y 1YRJ respectivamente.

### 3.3.2.3. Estructura de las metiltransferasas.

Se han cristalizado las metiltransferasas adquiridas que metilan  $m^7G1405$ , ArmA y RmtB,<sup>244</sup> así como la metilasa intrínseca de la bacteria ambiental *Micromonospora zionensis* productora de sisomicina, Sgm.<sup>245</sup>

De las metiltransferasas que metilan  $m^1A1408$ , se ha cristalizado la metilasa adquirida, NpmA,<sup>246</sup> identificada en una ocasión en el aislado de *E. coli* patógeno ARS3<sup>240</sup> así como la metilasa intrínseca, KamB, de la bacteria productora de tobramicina *Streptoalloteichus tenebrarius*.<sup>246</sup>



Schmitt *et al.* han conseguido la estructura completa de RmtB formando un complejo con S-adenosil homocisteína (AdoHcy) mientras que la estructura obtenida para ArmA está truncada y comienza en el residuo 58.<sup>244</sup> La estructura de RmtB consta de una resolución de 1,2 Å y está constituida en dos partes:

La **región C-terminal** que contiene los clásicos pliegues de las metiltransferasas de clase I (*Rossmann-like core*)<sup>247</sup> que consisten en siete láminas  $\beta$  (hebras 1-7) con hélices a cada lado (Z, A, B y D, D' y E). No existe una hélice que una las láminas 3 y 4 al igual que en algunos miembros de las metiltransferasas de clase I (Figura 22). Éste es el dominio metiltransferasa (Dominio MTasa) que comprende los residuos 89-251.

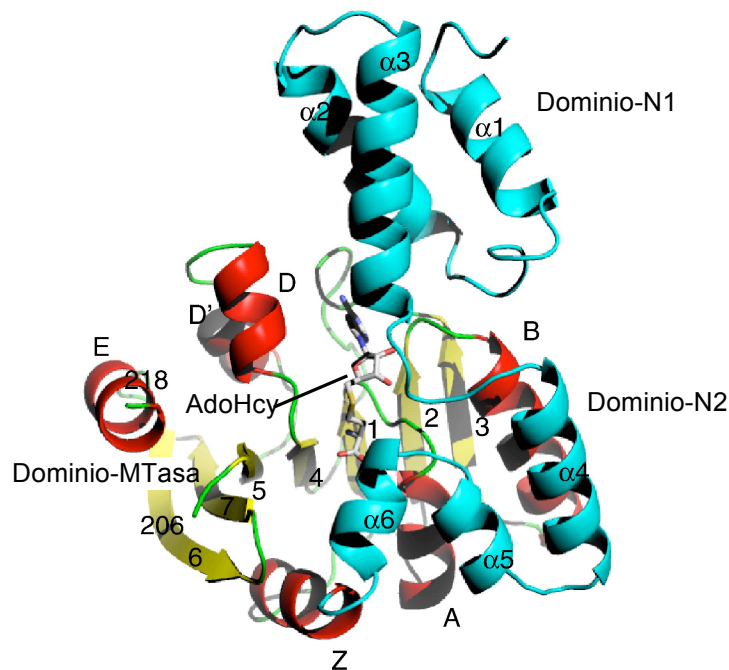
La **región N-terminal** contiene dos grupos de tres  $\alpha$ -hélices antiparalelas ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 6) denominados dominios N1 y N2 (Figura 22). Comprende los residuos 2-88. La región N-terminal de RmtB es específica de las metiltransferasas de m<sup>7</sup>G1405 que confieren resistencia a aminoglucósidos ya que esta región no comparte identidad con ningún homólogo de otras metiltransferasas de clase I ni con otras proteínas conocidas.<sup>247</sup>

Se ha determinado la importancia de K174 (en la  $\beta$ -lámina 4 del dominio MTasa) que al ser remplazado por una alanina reduce su CMI (concentración mínima inhibitoria) a tobramicina de >1024 mg/L a 0,5 mg/L. Así mismo, al purificar la proteína mutada en ese aminoácido y testar su habilidad para metilar *in vitro* la subunidad 30S de *E. coli*, su actividad se reduce a un 0,7 %. Dicho aminoácido parece estar implicado en la actividad catalítica de la enzima. Las mutaciones R181A (en  $\alpha$ -D del dominio MTasa) o H50A (en  $\alpha$ -3 del dominio N2) reducen también la CMI de tobramicina a 0,5 mg/L, atribuyendo esta disminución a que dichos residuos están implicados en la interacción con el sustrato de ARN.

La especificidad de las metiltransferasas que confieren resistencia a aminoglucósidos se encuentra en el dominio N-terminal, el cual se ha estimado que mantiene un contacto específico con el sustrato de ARN. Además, se ha observado que el dominio N2 es necesario para la unión del cofactor mientras que el dominio N1 es prescindible. Sin embargo, se requiere un dominio N-terminal completo para que exista actividad. En RmtB se ha observado que el aminoácido R87 estrictamente

conservado en el dominio N2 hace un contacto importante con el AdoMet. Además este aminoácido se encuentra en la región específica de unión al sustrato de ARN de las metilasas de  $m^7G1405$  y por tanto se cree que el diseño de un inhibidor específico podría tener como diana esta región del dominio N2.

**Figura 22. Estructura de RmtB unida a AdoHcy.** En el dominio N-terminal (azul) aparecen indicados



los dominios N1 y N2. El dominio MTasa muestra las  $\alpha$ -hélices (rojo), las  $\beta$ -láminas (amarillo) y los bucles (verde). La estructura de AdoHcy aparece también señalada mostrando una unión fuerte de dicho ligando a la región C-terminal de las  $\beta$ -láminas 1 y 2.

#### 3.3.2.4. RmtB ( $m^7G1405$ adquirida) *versus* Sgm ( $m^7G1405$ intrínseca).

Como ya se ha mencionado anteriormente, además de las estructuras cristalizadas de las metiltransferasas adquiridas por bacterias patógenas ArmA y RmtB que metilan en  $m^7G1405$ , también ha sido estudiada la estructura de la metiltransferasa intrínseca Sgm de la bacteria ambiental productora de sisomicina *Micromonospora zionensis* que metila este mismo nucleótido.<sup>245</sup>

Se ha observado una conservación de la estructura entre metilasas de los productores de aminoglucósidos (Sgm) y de bacterias patógenas (RmtB) tanto en el dominio MTasa, común en todas las metiltransferasas de clase I dependientes de SAM,

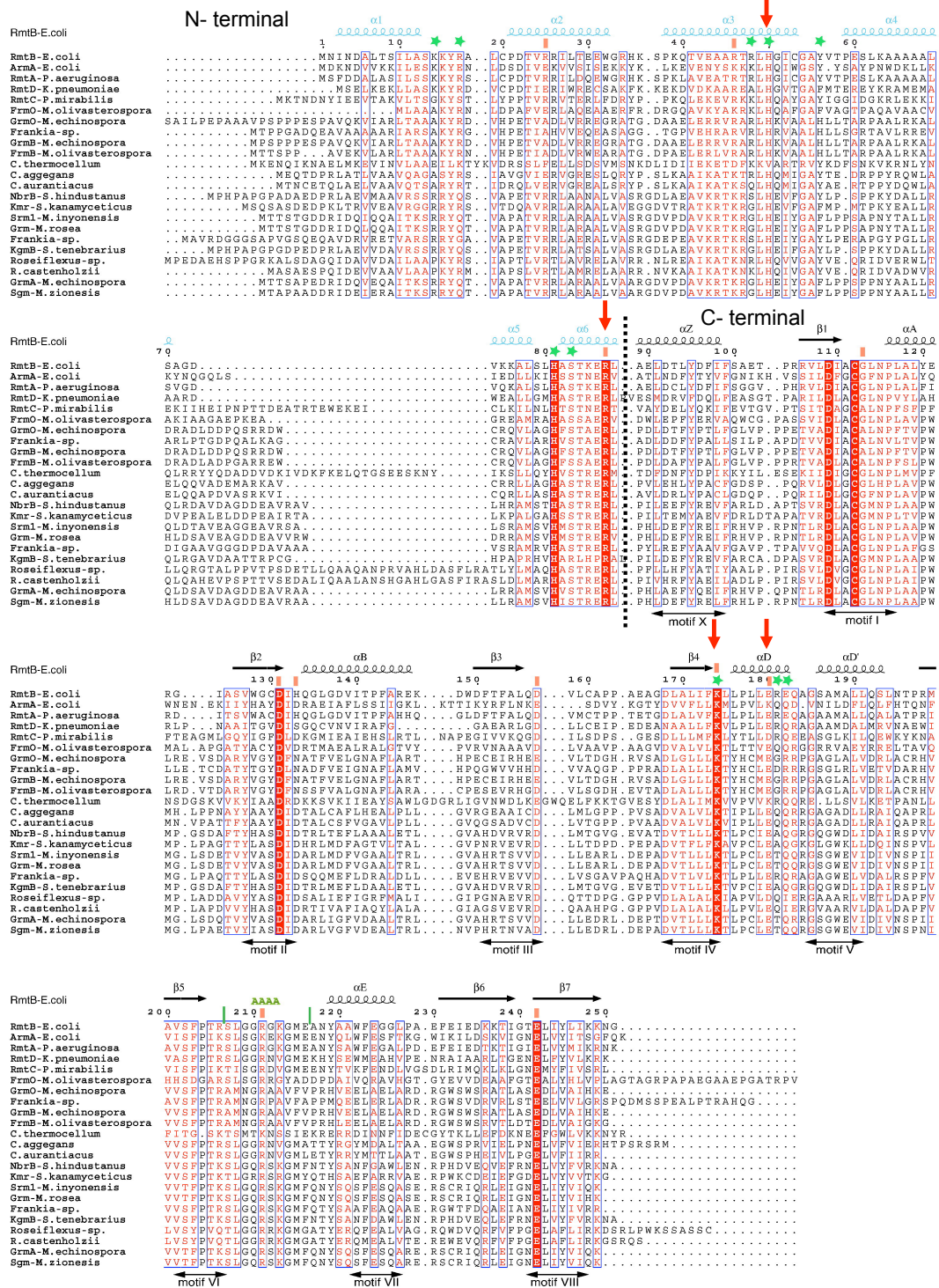
como en la región específica de las metilasas de m<sup>7</sup>G1405 (Figura 23). De esta manera Sgm y RmtB van a compartir residuos clave tanto de la región común como de la específica. En Sgm, el residuo K199 (que equivale a K174 en RmtB) también va a estar implicado en la unión a su diana en el ribosoma y aunque su mutación a alanina disminuye su CMI a los aminoglucósidos 4,6-2-DOS, mantiene cierta afinidad por el AdoMet en ensayos realizados *in vitro*.<sup>248,249</sup> Así mismo R108 (R87 en RmtB), que como ya se había sugerido parece contribuir en la unión específica al sustrato de ARN, reduce su CMI de >1280 mg/L a 2 mg/L cuando se muta a alanina.

### 3.3.2.5. Análisis de MTasas m<sup>7</sup>G para el diseño de inhibidores específicos de las MTasas de m<sup>7</sup>G1405.

Una de las maneras posibles de atacar a las metilasas adquiridas y restaurar la eficacia clínica de los aminoglucósidos existentes es mediante el desarrollo de inhibidores que bloqueen de manera específica a dichas metilasas.

En el trabajo realizado por Husain *et al.*<sup>245</sup> se han analizado mediante acoplamiento molecular y el análisis comparativo de secuencias, diferentes estructuras cristalizadas y modelos moleculares disponibles de metiltransferasas m<sup>7</sup>G de la superfamilia RFM. En dicho análisis se han incluido las estructuras cristalizadas de Sgm como representante de las m<sup>7</sup>G1405 del ARNr que confieren resistencia a aminoglucósidos, TrmB que metila m<sup>7</sup>G46 del ARNr<sup>250</sup> y RsmG que metila m<sup>7</sup>G527 del ARNr 16S<sup>251</sup> y el modelo molecular Bud23 como representante de eucariotas que metila m<sup>7</sup>G1575 del ARNr 18S.<sup>252</sup> En el acoplamiento molecular utilizado para predecir la orientación de ligandos en Sgm, TrmB y RsmG, se ha empleado la orientación del AdoMet y en la metilasa Ecm1 que modifica G0 en el ARNm de eucariotas se ha empleado la guanosina que había sido previamente determinada experimentalmente.<sup>253</sup> En el análisis comparativo de secuencias han añadido también el modelo de Bud32. La tabla 5 muestra los residuos clave de unión al AdoMet y a la guanosina en Sgm y demás metiltransferasas m<sup>7</sup>G, resultado del estudio realizado por Husain *et al.*<sup>245</sup>

## Introducción. Metiltransferasas del ARNr 16S.



**Figura 23. Alineamiento de secuencias homólogas a RmtB con metilasas adquiridas e intrínsecas que metilan en G1405 del ARNr 16S. Adaptada de Schmitt *et al.*<sup>244</sup> En la parte superior del alineamiento aparecen señaladas las diferentes partes que constituyen su estructura mediante flechas horizontales ( $\beta$ -láminas) y hélices ( $\alpha$ -hélices). Los aminoácidos clave K174, R181 y H50 que se han mutado a alanina mediante mutagénesis dirigida aparecen señalados con una flecha roja, así como el aminoácido R87 específico de las metilasas de m<sup>7</sup>G1405. Sgm aparece incluida.**

**Tabla 5. Residuos clave implicados en la unión al AdoMet (muy conservados entre metiltransferasas m<sup>7</sup>G) y a la guanosina (específicos).** Adaptada de Husain *et al.*<sup>245</sup>

		Sgm	RmtB*	TrmB	RsmG	Ecm1	Bud23
	Sitio de metilación	m <sup>7</sup> G1405 ARNr 16S		m <sup>7</sup> G46 ARNt	m <sup>7</sup> G527 23S rRNA	m <sup>7</sup> Gppp(Np)n ARNm cap0	m <sup>7</sup> G1575 ARNr 18S
Unión AdoMet	motivo I	D131	D199	E44	D71	D70	D53
	motivo II	D156	D131	E69	D96	D94	D77
	motivo III	D182	D157	D96	R123	D122	D99
Unión Guanosina	motivo IV	K199	K174	P119	R139	F141, Y145	S118, Q121
	motivo VI	P229	P204	D154			
	motivo VIII			Y193		Y284	K194
	otros	F64 N-terminal E107	A45 E86		R52 H53	V220 E225	

\* Residuo equivalente en RmtB con respecto al indicado para Sgm al realizar un alineamiento.

Este tipo de estudios se ha realizado con el fin de conocer los residuos claves en la unión tanto al AdoMet como a la diana de las metilasas m<sup>7</sup>G resultando de gran utilidad para el desarrollo futuro de inhibidores específicos de las metilasas de m<sup>7</sup>G1405 que no interfieran con otras metilaciones fisiológicas del tipo m<sup>7</sup>G.

Dicho estudio ha revelado que los residuos clave de unión al cofactor AdoMet así como su modo de unión al mismo están conservados entre las m<sup>7</sup>G. Sin embargo la unión al sustrato es decir, su unión a la guanosina, es específica ya que los residuos clave de unión varían en gran medida entre cada grupo.

### 3.3.3. Epidemiología molecular de las metiltransferasas adquiridas.

#### 3.3.3.1. Orden cronológico de identificación.

El primer aislado clínico en el que se identificó una metiltransferasa que confería resistencia a aminoglucósidos fue en 1997 en Japón aunque éste no se publicó hasta 2003.<sup>254</sup> De la cepa de *P. aeruginosa* AR2 proveniente del esputo de un paciente se aisló RmtA, una metilasa del ARNr 16S que confería altos niveles de resistencia a los 4,6-2-DOS. Por otro lado, en 2002, se depositó en GenBank (Accession No. AF550415) la secuencia completa del plásmido pCTX-M3 portador del gen que codificaba para la β-lactamasa CTX-M3 que provenía de un *Citrobacter freundii* de Polonia. Ese plásmido era portador de un gen que codificaba para una presunta

metilasa del ARNr 16S pero que no llegó a caracterizarse como gen implicado en la resistencia a aminoglucósidos en aquel momento. En 2003, Galimand *et al.*<sup>255</sup> publicaron la presencia de ArmA, responsable de conferir altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos de uso clínico, en un aislado clínico de *Klebsiella pneumoniae* (BM4536).<sup>255</sup> La secuencia de *armA* resultó ser idéntica a la del gen previamente detectado en el plásmido pCTX-M3.

Posteriormente, se han identificado hasta once metiltransferasas diferentes del ARNr 16S que metilan G1405 en bacterias patógenas Gram-negativas. RmtB y RmtC se identificaron por primera vez en aislados clínicos en Japón de *Serratia marcescens* (cepa S-95) y de *Proteus mirabilis* (cepa ARS68) respectivamente.<sup>256,257</sup> La secuencia de RmtB2 se encuentra en genbank (JN968578) y se obtuvo a partir de un *Enterobacter cloacae* aislado de una muestra de sangre en 2012. RmtD fue descubierta en una cepa clínica de *P. aeruginosa* (cepa PA0965) en Brasil.<sup>258</sup> RmtD2, que presentaba 9 sustituciones aminoacídicas, fue aislada de una muestra clínica de *Enterobacter aerogenes* (cepa Q4079) en Argentina.<sup>259</sup> RmtE se identificó por primera vez en una cepa de un *E. coli* comensal proveniente de ganado bovino en Estados Unidos.<sup>260</sup> Recientemente, se ha identificado RmtF en aislados clínicos de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii* y *E. cloacae* de India así como en *K. pneumoniae* de Reino Unido.<sup>199</sup> Así mismo se ha descrito por primera vez RmtG en cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* en Brasil<sup>200</sup> y RmtH en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de una herida de guerra de un soldado de Iraq.<sup>201</sup>

Tan solo se ha identificado una metiltransferasa adquirida que metile el residuo N1-A1408, NpmA. Se identificó por primera y única vez en un aislado clínico de *E. coli* (cepa ARS3) en Japón en 2007.<sup>240</sup> NpmA confiere un espectro de resistencia a aminoglucósidos mayor que las metilasas de G1405. Además, el gen *npmA* se encontró en un plásmido conjugativo que fue transferido de forma exitosa a una cepa de *E. coli* receptora. Aún así, no se ha vuelto a describir ningún aislado portador de este determinante de resistencia.

### 3.3.3.2. Distribución mundial.

Aunque este mecanismo de resistencia adquirido fue descrito por primera vez a partir de un aislado clínico de 1997 no se puede decir exactamente en qué momento las bacterias patógenas adquirieron este mecanismo de resistencia por primera vez.

Las metiltransferasas adquiridas descritas hasta la fecha se encuentran, por norma general, mediadas por elementos genéticos móviles como transposones que en la mayor parte de las ocasiones forman parte de plásmidos transferibles aunque también se han identificado metiltransferasas integradas en el cromosoma bacteriano. Su presencia en plásmidos ha favorecido la transferencia de este mecanismo de resistencia entre especies bacterianas y una rápida diseminación mundial en los últimos años, habiéndose descrito a día de hoy en los cinco continentes en más de 30 países (Figura 24). Además, el hecho de que este mecanismo confiera muy altos niveles de resistencia a todos los aminoglucósidos disponibles para uso clínico supone una gran amenaza a día de hoy.

La mayor parte de la búsqueda de este mecanismo de resistencia se ha realizado en patógenos Gram-negativos de manera que actualmente estas metiltransferasas se han encontrado ampliamente distribuidas principalmente en especies bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, así como en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, patógenos Gram-negativos de gran interés nosocomial. No se han identificado todavía bacterias patógenas Gram-positivas que hayan adquirido este mecanismo de resistencia aunque se ha comprobado que son activas en *S. aureus* y *B. Subtilis*<sup>241,242</sup> mostrando altos niveles de resistencia a aminoglucósidos.

A día de hoy se han identificado metilasas adquiridas en cepas de aislados clínicos tanto humanos como de perros y gatos así como en aislados pertenecientes a animales de producción incluyendo a cerdos, vacas y aves. Por último, también se han descrito en cepas aisladas a partir de alimentos y del ambiente.



Las metilasas más prevalentes hoy en día son ArmA y RmtB.<sup>198</sup> ArmA se ha encontrado ampliamente distribuida en los cinco continentes en cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* así como en *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha descrito en aislados clínicos humanos, de animales de compañía, de animales de producción y en alimentos. RmtB se ha descrito en la familia *Enterobacteriaceae* y en *Acinetobacter baumannii* también en aislados clínicos humanos, de mascotas, de animales de producción y su entorno pero no en alimentos. Las siguientes en prevalencia, aunque en menor medida, son RmtC y RmtD. RmtC se ha descrito en los cinco continentes únicamente en *Enterobacteriaceae* en aislados clínicos humanos y también en alimentos.<sup>198</sup> RmtD en cambio se ha limitado a Sudamérica (Brasil, Chile y Argentina)<sup>200</sup> habiéndose descrito en *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* provenientes de aislados clínicos humanos, considerándose de alta prevalencia en Brasil, y en un río de dicho país. Las demás metilasas se han descrito de manera esporádica siempre en cepas humanas y además, RmtE también se ha descrito una vez en una cepa de *E. coli* en ganado vacuno.<sup>260</sup>

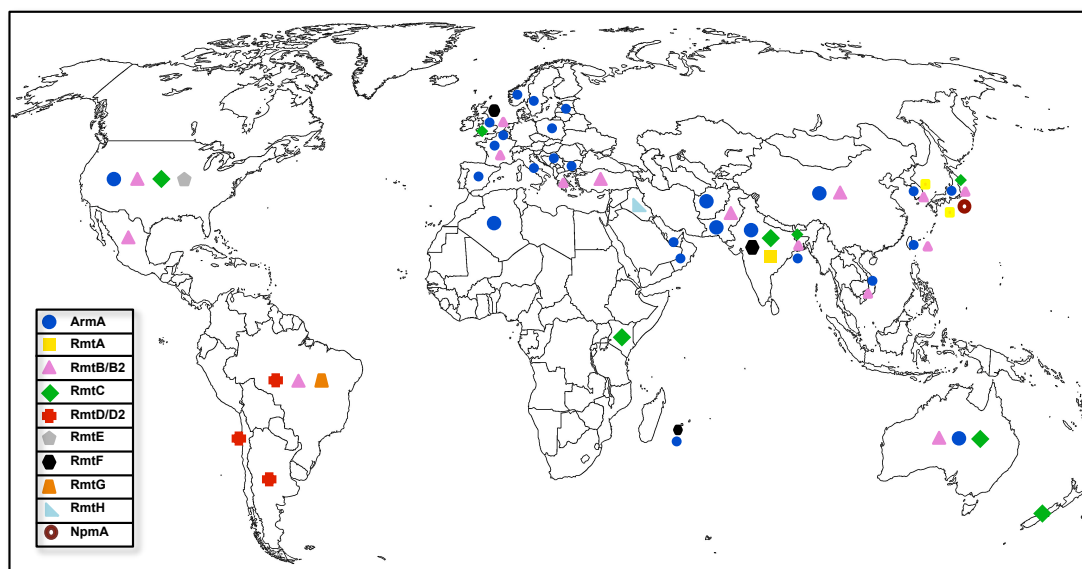


Figura 24. Mapa global de la distribución actual de las metilasas adquiridas.

La metilasas adquiridas, como se ha señalado anteriormente, se han encontrado en su gran mayoría asociadas a plásmidos. No obstante en ocasiones se han observado integradas en el cromosoma bacteriano. Es el caso de *rmtD*, que siempre se ha descrito en el cromosoma de cepas clonalmente relacionadas (incluso en un aislado procedente de un río); aunque por el contrario *rmtD2*, que a pesar de poseer un entorno genético



similar al de *rmtD*, se ha descrito formando parte de un plásmido conjugativo.<sup>261-263</sup> *rmtC*, que en un principio también había estado asociado a plásmidos, también se ha identificado a nivel cromosómico en cepas de *S. enterica* serovar Virchow en Reino Unido procedentes de aislados clínicos humanos y de alimentos relacionados clonalmente.<sup>264</sup> Así mismo *rmtH*, descrito tan sólo una vez hasta el momento, también fue identificado en el cromosoma de un aislado de *Klebsiella pneumoniae*.<sup>201</sup> Por el contrario *armA* y *rmtB*, que son los más prevalentes, se han encontrado asociados a plásmidos en todas las ocasiones.

### 3.3.3.3. Otros determinantes de resistencia emergentes que coexisten con las metilasas adquiridas.

En la mayoría de las ocasiones las metilasas de resistencia a aminoglucósidos se encuentran mediadas por plásmidos que a su vez pueden acumular varios genes de resistencia a antibióticos. De esta manera, incluso se han identificado especies en las que coexisten dos metilasas distintas, como es el caso reciente de *rmtF*, que coexiste con *armA*, *rmtC* o *rmtB* en cepas humanas de la India,<sup>199</sup> como la coproducción de *armA* y *rmtB* en cepas aisladas en Taiwan<sup>265</sup> o como de *armA* y *rmtC* en cepas aisladas en Pakistan.<sup>266</sup> A su vez, resultan de gran preocupación las especies patógenas productoras de metilasas de resistencia que portan además determinantes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos o a quinolonas, principalmente, ya que estos antibióticos son imprescindibles en la medicina actual.

#### 3.3.3.3.1. Coexistencia con determinantes de resistencia a $\beta$ -lactámicos.

Los  $\beta$ -lactámicos son antibióticos de gran relevancia en clínica y por tanto la coproducción de metilasas que confieren resistencia a aminoglucósidos y determinantes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos supone una gran amenaza. La producción de  $\beta$ -lactamasas, enzimas que inactivan a los  $\beta$ -lactámicos impidiendo su entrada en el interior de la célula, es el mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos más extendido en enterobacterias y otros bacilos Gram-negativos. Por tanto no es de extrañar que dicho mecanismo se haya visto asociado a las metilasas adquiridas.

La producción de metilasas adquiridas se vio en un principio asociada a la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBLs), principalmente del tipo CTX-M.<sup>198</sup> Posteriormente se ha observado la coexistencia de estas metilasas adquiridas junto con  $\beta$ -lactamasas capaces de hidrolizar carbapenemas, lo que resulta de especial importancia debido a la gran relevancia del empleo de dichos antibióticos en el tratamiento de infecciones causadas por Gram-negativos a día de hoy. Es el caso de la coproducción de la metalo- $\beta$ -lactamasa NDM-1 y RmB, RmtC, ArmA o RmtF<sup>199,267,268</sup> resultando mucho más preocupante en cuanto a su diseminación cuando a su vez estos dos determinantes están localizados en un mismo plásmido conjugativo de amplio espectro.<sup>269,270</sup> A su vez también se ha identificado la coproducción de RmtD y SPM-1 en aislados clínicos y en un río de Brasil, estando todos relacionados clonalmente.<sup>261-263</sup> Otras metalo- $\beta$ -lactamasas tales como IMP-, VIM-, OXA- y KPC- se han visto asociadas también a las metilasas adquiridas.<sup>198</sup>

#### 3.3.3.3.2. Coexistencia con determinantes de resistencia a quinolonas.

Las quinolonas son antibióticos sintéticos ampliamente empleados en medicina humana y veterinaria. La resistencia a quinolonas se debe principalmente a la presencia de mutaciones en genes que codifican para sus dianas, la ADN girasa y la topoisomerasa IV, que se encargan del manejo de la topología del cromosoma de la bacteria. Las bombas de eflujo que expulsan a los antibióticos hacia el exterior de la célula también son un mecanismo extendido. Estos dos mecanismos se han visto asociados al cromosoma bacteriano. No obstante, en los últimos años se han descrito mecanismos de resistencia a quinolonas emergentes asociados a plásmidos como las proteínas Qnr que son pentapéptidos que protegen la diana de las quinolonas de la acción de dichos antibióticos, la enzima modificadora AAC(6')-Ib-cr o la bomba de eflujo QepA.<sup>271</sup> Estos mecanismos de reciente aparición han ido cobrando importancia en el ámbito clínico. De esta forma, se ha observado una coproducción de ArmA y RmtB con las proteínas Qnr así como con la enzima AAC(6')-Ib-cr.<sup>268,272,273</sup> Así mismo, RmtB se ha visto asociado a QepA en cepas provenientes de aislados de origen humano, de animales de compañía y de animales de granja.<sup>273-276</sup>



## Objetivos y justificación

Imagen: Ilustración en la que aparece Louis Pasteur (1822-1895), pionero de la microbiología moderna, llevando a cabo los experimentos que refutaron definitivamente la teoría de la generación espontánea. Pertenece a una serie ilustraciones que realizó Robert Thom en representación de la historia de la medicina, en 1950, encargadas por la compañía farmacéutica Parke-Davis & Co. Actualmente en *University of Michigan Health System*.

## OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

La resistencia a antimicrobianos en bacterias representa una de las mayores amenazas en la medicina actual. A día de hoy, la rápida aparición y diseminación de mecanismos de resistencia frente a todos los antibióticos de uso clínico sumado a la escasez en el descubrimiento y diseño de nuevas moléculas ha dado lugar a infecciones causadas por bacterias multirresistentes imposibles de tratar con los antibióticos disponibles.

Este trabajo de Tesis Doctoral tiene como objetivo estudiar el comportamiento a nivel biológico de las metilasas adquiridas del ARNr 16S que confieren altos niveles de resistencia a todos los aminoglucósidos disponibles para uso clínico. Este mecanismo de resistencia ha emergido recientemente en bacterias patógenas diseminándose de manera muy rápida por todo el mundo desde que en 2003 fuera descrito por primera vez. La mayor parte de los estudios realizados sobre las metilasas del ARNr 16S hasta la fecha son epidemiológicos. Por ello, los objetivos principales de esta Tesis Doctoral son el estudio del mecanismo de acción y coste biológico de estas metiltransferasas adquiridas por patógenos Gram-negativos, además de la repercusión que origina la incorporación de esta nueva metilación en las modificaciones fisiológicas adyacentes de una estructura tan conservada como es el ribosoma. El responder a este tipo de cuestiones nos permitirá un conocimiento de estas metilasas adquiridas a un nivel más molecular y obtener algunas de las claves para explicar su adquisición y rápida expansión.

Así mismo, el aumento en el número de aislados de *P. aeruginosa* portadoras de RmtD resulta alarmante debido a que los aminoglucósidos son el tratamiento de elección para infecciones causadas por este patógeno. Es por ello que nos hemos planteado, como segundo objetivo de esta tesis, el estudio de las modificaciones fisiológicas en las regiones de unión de los aminoglucósidos en el ARNr de *P. aeruginosa* así como la caracterización de la metilasa adquirida RmtD, ambas desconocidas hasta la fecha. Se trata de un primer paso necesario a realizar con el fin de poner remedio a este problema a corto-medio plazo.

De forma complementaria a los objetivos principales de esta tesis, pretendemos identificar en aislados clínicos la presencia de perfiles de resistencia a múltiples antibióticos, incluyendo a los aminoglucósidos, con el fin de estudiar las bases genéticas de la coexistencia en una misma cepa de diferentes mecanismos de resistencia.



*Objectives and  
justification*

Imagen: Juego educativo para niños inspirado en el laboratorio de Louis Pasteur. Carolyn MFG Co., New York. *ca.* 1930.



## **OBJECTIVES AND JUSTIFICATION**

Antimicrobial resistance in bacteria constitutes one of the major threats in current medicine. Nowadays, the rapid development and dissemination of resistance mechanisms against all clinically applied antimicrobials coupled with the lack of discovery and design of new antimicrobials has led to infections caused by multiresistant bacterial pathogens with no existing treatment.

One of the main goals of this Doctoral Thesis is to unravel the impact of acquired 16S rRNA methyltransferases conferring high-level resistance to all the aminoglycosides available for medical practice. This resistance mechanism has recently emerged in pathogenic bacteria and rapidly disseminated globally since it was first described in 2003. Most of the studies related to aminoglycoside resistance methyltransferases to date are epidemiological. For this reason, the main objectives of this Doctoral Thesis are to study the mechanisms of action and biological cost of the acquisition of 16S rRNA methyltransferases by gram-negative pathogens; as well as the repercussions that originate due to the incorporation of this new modification on the adjacent physiological modifications in such a highly conserved structure as the ribosome. All these answers provide insights regarding their acquisition and fast dissemination.

The increased number of isolates of *P. aeruginosa* bearing RmtD, one of the acquired high-level aminoglycoside resistance methyltransferases, is a reason for concern as aminoglycosides are the treatment of choice for this type of infection. This has led us to dedicate the second major objective of this Doctoral Thesis to the study of the physiological modifications in the aminoglycoside rRNA targets of *P. aeruginosa* as well as the acquired modification carried out by RmtD, both of which are currently unknown. This constitutes a crucial initial study with the aim of solving this problem in the immediate future.

In addition to the main goals of this Doctoral Thesis, we also set out to detect multi-drug resistant profiles, involving aminoglycoside resistance, in clinical isolates. To study these emerging resistance determinants, their genetic environment and

mechanism of acquisition as well as their coexistence with other resistance genes in the same strain must be determined.



Publicaciones

Imagen: Vidriera en la iglesia de St. James, en Londres, en la que aparece representado Alexander Fleming.

## PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral se presenta en formato de publicaciones. Los tres trabajos que la componen se han publicado en las revistas “*Antimicrobials Agents and Chemotherapy*” (ISI 2012, Factor de impacto: 4,565), “*RNA biology*” (ISI 2012, Factor de impacto: 4,841) y “*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*” (ISI 2012, Factor de impacto: 5,338).



## ***I. Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases.***

Las metiltransferasas de la familia Arm/Rmt han emergido en bacterias patógenas siendo enzimas que confieren altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos 4,6-disustituídos mediante la metilación de la posición G1405 del ARNr 16S. En procariotas, las metilaciones nucleotídicas son las modificaciones post-transcripcionales del ARNr más comunes, mediadas por metiltransferasas intrínsecas, que optimizan la función del ribosoma. Aquí mostramos que mientras la metiltransferasa de resistencia adquirida, RmtC, metila G1405; también impide la metilación intrínseca mediada por RsmF en C1407, un nucleótido que también forma parte del bolsillo de unión de los aminoglucósidos en el ARNr 16S. Para entender el origen y las consecuencias de este fenómeno, hemos construido una serie de mutantes de inserción y de delección en *Escherichia coli* que se corresponden con los genotipos *rsmF*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *rsmF*, *rsmF*<sup>+</sup>/*rmtC*<sup>+</sup> y  $\Delta$ *rsmF*/*rmtC*<sup>+</sup>. Al analizar el patrón de resistencia del mutante  $\Delta$ *rsmF*, hemos observado una disminución de la susceptibilidad a aminoglucósidos incluyendo a los 4,5 y 4,6 disustituídos 2-deoxiestreptaminos, mostrando que la metilación endógena en C1407 está involucrada en la susceptibilidad intrínseca a los aminoglucósidos. Los ensayos de competición entre las diferentes cepas isogénicas de *E. coli* han demostrado que la adquisición de *rmtC* no supone un coste adicional para la bacteria. Finalmente, La espectrometría de masas MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) nos ha permitido determinar que RmtC metila el residuo G1405 tanto en presencia como en ausencia de aminoglucósidos. Por lo tanto, el hecho de que la adquisición de una metilasa de resistencia influya en las metilaciones intrínsecas modificando el patrón de metilación endógeno de la bacteria, lleva a pensar en la selección y mantenimiento de las metiltransferasas de la familia Arm/Rmt dando lugar a unos ribosomas resistentes a los aminoglucósidos, amenazando peligrosamente la eficacia de los mismos.







## Fitness Cost and Interference of Arm/Rmt Aminoglycoside Resistance with the RsmF Housekeeping Methyltransferases

Belen Gutierrez,<sup>a,b</sup> Jose A. Escudero,<sup>a,b</sup> Alvaro San Millan,<sup>a,b</sup> Laura Hidalgo,<sup>a,b</sup> Laura Carrilero,<sup>a,b</sup> Cristina M. Ovejero,<sup>a,b</sup> Alfonso Santos-Lopez,<sup>a,b</sup> Daniel Thomas-Lopez,<sup>a,b</sup> and Bruno Gonzalez-Zorn<sup>a,b</sup>

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain,<sup>a</sup> and Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain<sup>b</sup>

Arm/Rmt methyltransferases have emerged recently in pathogenic bacteria as enzymes that confer high-level resistance to 4,6-disubstituted aminoglycosides through methylation of the G1405 residue in the 16S rRNA (like ArmA and RmtA to -E). In prokaryotes, nucleotide methylations are the most common type of rRNA modification, and they are introduced posttranscriptionally by a variety of site-specific housekeeping enzymes to optimize ribosomal function. Here we show that while the aminoglycoside resistance methyltransferase RmtC methylates G1405, it impedes methylation of the housekeeping methyltransferase RsmF at position C1407, a nucleotide that, like G1405, forms part of the aminoglycoside binding pocket of the 16S rRNA. To understand the origin and consequences of this phenomenon, we constructed a series of in-frame knockout and knock-in mutants of *Escherichia coli*, corresponding to the genotypes *rsmF*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *rsmF*, *rsmF*<sup>+</sup> *rmtC*<sup>+</sup>, and  $\Delta$ *rsmF* *rmtC*<sup>+</sup>. When analyzed for the antimicrobial resistance pattern, the  $\Delta$ *rsmF* bacteria had a decreased susceptibility to aminoglycosides, including 4,6- and 4,5-deoxystreptamine aminoglycosides, showing that the housekeeping methylation at C1407 is involved in intrinsic aminoglycoside susceptibility in *E. coli*. Competition experiments between the isogenic *E. coli* strains showed that, contrary to expectation, acquisition of *rmtC* does not entail a fitness cost for the bacterium. Finally, matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry allowed us to determine that RmtC methylates the G1405 residue not only in presence but also in the absence of aminoglycoside antibiotics. Thus, the coupling between housekeeping and acquired methyltransferases subverts the methylation architecture of the 16S rRNA but elicits Arm/Rmt methyltransferases to be selected and retained, posing an important threat to the usefulness of aminoglycosides worldwide.

Aminoglycosides are used for the treatment of a wide range of infections due to both Gram-negative and Gram-positive bacteria and have been classified by the World Health Organization as critically important antibiotics in human medicine (34). They bind to the A site of the 16S rRNA and force A1492 and A1493 to “flip out” of helix 44 (29, 32). This molecular switch is similar to the one that these two universally conserved nucleotides adopt when there is a cognate fit between the mRNA codon and the tRNA anticodon, which is essential for the process of monitoring of the protein synthesis. Therefore, the conformation adopted when the aminoglycosides bind to their target causes a loss of translational fidelity, leading to accumulation of erroneous proteins and to bacterial death (26). Resistance to these antimicrobials is usually due to production of aminoglycoside-modifying enzymes (such as acetyltransferases, phosphorylases, and adenylyltransferases) (30), reduced intracellular antibiotic accumulation, or mutation of ribosomal proteins or rRNA. An additional mechanism, methylation of the aminoacyl site of 16S rRNA, confers high-level resistance to clinically important aminoglycosides such as amikacin, tobramycin, and gentamicin. This phenomenon is mediated by a group of 16S rRNA methyltransferases that share similarity with those produced by actinomycetes, such as *Streptomyces* spp. and *Micromonospora* spp. In these species, 16S rRNA methylation protects their ribosomes from the toxic effects of their own aminoglycoside production (8). Six acquired 16S rRNA methyltransferase genes conferring resistance to these antimicrobials, i.e., *armA* in human, animal, and food isolates (15, 16, 17), *rmtA* (35), *rmtB* (11), *rmtC* (33), *rmtD* (12), and *rmtE* (10), have been identified in clinical bacterial strains and are now distributed worldwide. The target of these methyltransferases is the N7 position of nucleotide G1405 in 16S rRNA (*Escherichia coli* numbering), and it confers high-level resistance to the 4,6-disubstituted aminoglycosides such as gentamicin

and tobramycin (24). The methylation takes place after the assembly of the 30S subunit, which increases the opportunity to methylate the target. These methyltransferases have the sole function of providing protection against aminoglycosides. In this aspect, they contrast with the numerous endogenous housekeeping methyltransferases that are important for the structure and function of mature rRNA (25, 1). However, the resistance and the housekeeping methylations are similar in that they cluster in phylogenetically conserved and functionally essential regions of the rRNA. At the ribosomal A site of *E. coli* 16S rRNA, where the aminoglycoside binding pocket is located, several nucleotides, including C1402 (21), C1407 (1), U1498 (4), and A1518 and A1519 (19), are posttranscriptionally methylated by housekeeping methyltransferases. It seems that there is an evolved order of methylation steps within endogenous housekeeping methyltransferases to avoid crowding and possible stereo-electronic effects on downstream methylations introduced by these modifications. Such constraints would require synchronization of resistance-mediating RNA methyltransferases with the other, housekeeping methyltransferases. It has recently been observed that the expression in *E. coli* of Sgm, a methyltransferase that confers aminoglycoside resistance by methylation of m<sup>7</sup>G1405 from an antibiotic-producing strain, decreases the methylation function of endogenous *E. coli* RsmF, an

Received 3 November 2011 Returned for modification 24 December 2011

Accepted 5 February 2012

Published ahead of print 13 February 2012

Address correspondence to Bruno Gonzalez-Zorn, bgzorn@vet.ucm.es.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.06066-11

m<sup>5</sup>C1407-specific housekeeping methyltransferase (7). However, it is not known if similar methylation displacements occur with the emerging Arm/Rmt methyltransferases. Finally, the role of the presence or absence of aminoglycosides in the methylation of the aminoglycoside binding pocket of the ribosome, as well as the repercussion of these methylations in ribosome function and bacterial fitness, remains to be elucidated.

In this study, we have observed an interaction between the methylation at C1407 introduced by RsmF and the methylation at G1405 produced by acquired ArmA/Rmt methyltransferases. We have analyzed the consequences of this interaction for bacterial fitness in the presence and absence of antibiotics. Furthermore, we have identified that the housekeeping methyltransferase RsmF plays a role in intrinsic susceptibility to aminoglycosides in the presence and in the absence of the acquired methyltransferase RmtC. Finally, we have dissected the biological cost entailed by acquired, resistance-mediating aminoglycoside methyltransferases.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains and plasmids.** *E. coli* BW25113 (*lacI<sup>q</sup> rrnBT14 ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33 ΔrhaBADLD78*), here called BB1074 wt, was used for the construction of the mutants. BB1075  $\Delta rsmF$ , BB1076 *rmtC*<sup>+</sup>, and BB1077  $\Delta rsmF$  *rmtC*<sup>+</sup> are the mutants constructed in this work. *Salmonella* Virchow H0 5366 0426 bearing *rmtC* was used as the DNA template for the construction of the *rmtC* insertion mutant (20). *E. coli* MUR050 bearing *armA* and *E. coli* bearing *rmtB* were used for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI MS) (16).

The vector used for the cloning of the *rmtB* PCR product was pCRII-pTOPO (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), and *E. coli* Top10 was used as the receptor for the transformation of the pCRII-pTOPO cloning vector. plasmid pKD13 (GenBank Accession number AY048744) contains an FLP recombination target (FRT)-flanked kanamycin resistance (*kan*) gene and was used as a PCR template in order to construct the deletion mutants. pKD46 Red helper plasmid (GenBank Accession number AY048746) (9) was used for the homologous recombination of the generated PCR products with the chromosome of *E. coli* BW25113, and pCP20 FLP helper plasmid from BT340 (DH5a carrying pCP20 [5]) was used for the elimination of the FRT-flanked resistance gene.

**Plasmid stability experiments.** The curing rates of plasmid pTOPO and pTOPO bearing *rmtB* in *E. coli* Top10 transformants were determined as previously described (31). Strains were grown for 16 h at 37°C in LB medium, and then 10<sup>6</sup> CFU of each strain was grown in 50 ml of antibiotic-free LB medium at 37°C and 100 rpm. The cultures were diluted 1:1,000 into 50 ml of fresh LB medium every 24 h. Samples were taken every 24 h for 8 days. The proportion of bacteria harboring pTOPO was determined by plating subculture steps on brain heart infusion (BHI) agar plates and further replication on BHI agar plates and BHI agar plates containing ampicillin (25 µg/ml) or kanamycin (25 µg/ml). Colonies that had lost the plasmids were able to grow on BHI agar plates but not in BHI broth with ampicillin or kanamycin, while colonies harboring pTOPO or pTOPO bearing *rmtB* were able to grow on both plates. The rate of plasmid curing was calculated (data not shown).

**Construction of single-gene deletion *rsmF* mutants and insertion *rmtC* mutants in *E. coli*.** *E. coli* BW25113 carrying the Red helper plasmid pKD46 was used for the construction of the deletion and the insertion mutants. To carry out the in-frame *rsmF* knockout, a PCR was performed using pKD13 DNA as the template and Phusion high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Woburn, MA) for the amplification of the FRT-flanked kanamycin resistance (*kan*) gene subsequently used for mutant selection (3). The 5'-terminal deletion primer had a 50-nucleotide (nt) homologous extension that include the *rsmF* initiation codon and the 20-nt 5'-ATTCCGGGGATCCGTCGACC-3' priming site from pKD13, and the C-terminal deletion primer consisted of a 50-nt 5'-homologous

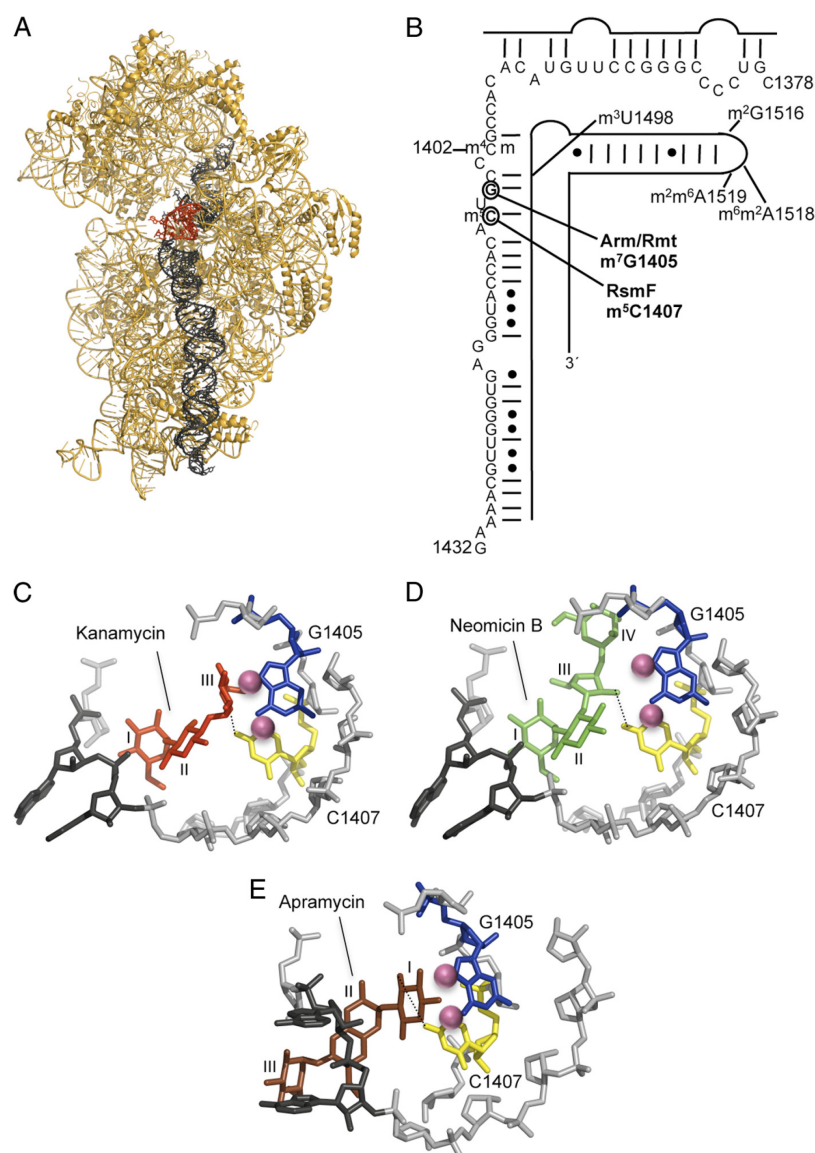
extension that include 21 nt for the *rsmF* C-terminal region, the termination codon and 29 nt downstream, and the 20-nt 5'-TGTAGCTGGAG CTGCTTCG-3' priming site from pKD13.

Chromosomal *rsmF* was deleted using a PCR amplicon as previously described (9). pCP20 FLP helper plasmid was used for the elimination of the FRT-flanked resistance gene from the *rsmF* deletion mutants as previously described (9). To carry out the *rmtC* insertion, a PCR using *rmtC*-positive *Salmonella* Virchow DNA as the template was performed. The *rmtC* upstream insertion primer had a 50-nt 5'-homologous extension that includes the *ycgE-ycgF* intergenic region and the 20-nt 5'-GTGCT CTGTGGATAACTTGC-3' priming site located upstream of the *rmtC* gene, and the *rmtC* downstream insertion primer consisted of 50 nt homologous to the *ycgE-ycgF* intergenic region (23) and the 20-nt 5'-TGCA AGGCTAGAGTCAAGCCA-3' priming site located downstream of the *rmtC* gene. Chromosomal *rmtC* was inserted using a PCR amplicon as previously described (9). PCRs and sequencing were used to confirm the genetic structures (data not shown).

**Growth rate and growth competition experiments.** Growth kinetics were determined for BB1074 wt and for the BB1075  $\Delta rsmF$ , BB1076 *rmtC*<sup>+</sup>, and BB1077  $\Delta rsmF$  *rmtC*<sup>+</sup> mutants. Volumes of 50 ml LB were inoculated independently with 10<sup>7</sup> CFU of each strain. Cultures were grown for 12 h at 37°C and 100 rpm, and the absorbance at 600 nm was measured every hour. Different pairs of these mutants were used in four independent competition experiments as previously described (27). Strains were grown for 16 h at 37°C in LB medium, and then 10<sup>6</sup> CFU of each strain was mixed in 50 ml of antibiotic-free LB medium. The mix was grown at 37°C and 100 rpm. The cultures were diluted 1:250 into 50 ml of fresh LB medium every 24 h. Samples were taken every 24 h for 10 days. For the competition experiments in which one competitor carried the aminoglycoside resistance gene *rmtC* for selection, i.e., BB1074 wt versus BB1076 *rmtC*<sup>+</sup>, BB1074 wt versus BB1077  $\Delta rsmF$  *rmtC*<sup>+</sup>, and BB1075  $\Delta rsmF$  versus BB1077  $\Delta rsmF$  *rmtC*<sup>+</sup>, aliquots were plated on nonselective LB agar, and the proportion of resistant colonies was deduced by replica plating of 100 colonies on LB agar plates containing 50 µg/ml of kanamycin. Antimicrobials were supplied by Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). For the competition experiment with BB1074 wt versus BB1075  $\Delta rsmF$ , which have no antibiotic resistance selective gene, aliquots were plated on nonselective LB agar, and the proportion of  $\Delta rsmF$  knockout mutants was deduced by performing PCR of 100 colonies with the oligonucleotides *rsmF*ant.F (5'-AACCGAAAGAGTGGCGTGAAT-3') and *rsmF*post.R (5'-TTCAGCCTAGTTGAGGCAGCC-3') in order to check whether the *rsmF* gene was present or not. The competition index (CI) represents the relative fitness and was calculated as the ratio of the mean CFU in four independent competition experiments for the resistant and susceptible strains at *t*<sub>1</sub> divided by the same ratio at *t*<sub>0</sub>. The selection coefficient *s* was calculated as the slope of the linear regression model  $s = \ln(CI)/\ln(d)$ , where *d* is the dilution factor (27). The selection coefficient estimates the difference between the relative fitnesses of the two competitors over the entire competition experiment.

**Antimicrobial susceptibility testing.** Antimicrobial susceptibilities of *E. coli* strains were determined by broth microdilution in microtiter plates (Sensititre EUMVS2; Trek Diagnostics, Inc., Westlake, OH), except for arbekacin, tobramycin, and neomycin, for which susceptibilities were determined with in-house microtiter plates according to the CLSI guidelines (6). Antibiotic quality control of the panels was performed with collection strain ATCC 25922 (*E. coli*).

**Analysis of rRNA by MALDI mass spectrometry.** Total rRNA was extracted from ribosomal particles isolated from *E. coli* BB1074 wt, the *E. coli* BB1076 *rmtC*<sup>+</sup> mutant, *E. coli* MUR050 (*armA*), and *E. coli* (*rmtB*). The 16S rRNA sequence from C1378 to G1432 was isolated by hybridization to complementary deoxyoligonucleotides, and 100 pmol of rRNA was heated with 500 pmol of deoxyoligonucleotide (complementary to the sequence shown in Fig. 1) for 1 min at 85°C, followed by slow cooling over 2 h to 45°C. Unhybridized regions of the rRNAs were digested with mung bean nuclease (NE Biolabs) and RNase A (Sigma), and the rRNA



**FIG 1** (A) Three-dimensional structure of the *E. coli* 30S subunit structure (Protein Data Bank [PDB] code 3I1M) (36). Helix 44 (gray) and the ribosomal A site (red) on the 16S rRNA are indicated. (B) Representation of the *E. coli* 16S rRNA secondary structure showing the sequence in helix 44 that was isolated for analysis by mass spectrometry. The sites of posttranscriptional methylations in this region, including  $m^5C1407$ , are indicated. The site of the  $m^7G1405$  modification added by the Arm/Rmt methyltransferase family is also shown. (C to E) Aminoglycoside interactions at the ribosomal A site on 16S rRNA (PDB codes 2ESI and 2ET4 [14] and 1YRJ [18]). The ribose skeleton of the 16S rRNA is shown in gray. Nucleotides A1492 and A1493 (dark gray), which participate in the fidelity of the cognate mRNA-tRNA codon-anticodon association, “flip out” of helix 44 in the presence of aminoglycosides. Nucleotides  $m^7G1405$  (blue) and  $m^5C1407$  (yellow) are shown. Methyl groups from both nucleotides (pink) are also indicated. Kanamycin 4,6-deoxystreptamine aminoglycoside (red) (C), neomycin B 4,5-deoxystreptamine (green) (D), and apramycin 4-deoxystreptamine aminoglycoside (brown) (E) are also represented. N4 of C1407 is implicated in the binding of these aminoglycosides, since it interacts both with ring III of kanamycin and neomycin B and with ring I of apramycin (dotted lines). Note that the methyl group in  $m^7G1405$  directly clashes only with ring III of kanamycin and not with neomycin B nor apramycin. These pictures were drawn with MacPyMOL (Schrödinger, LLC).

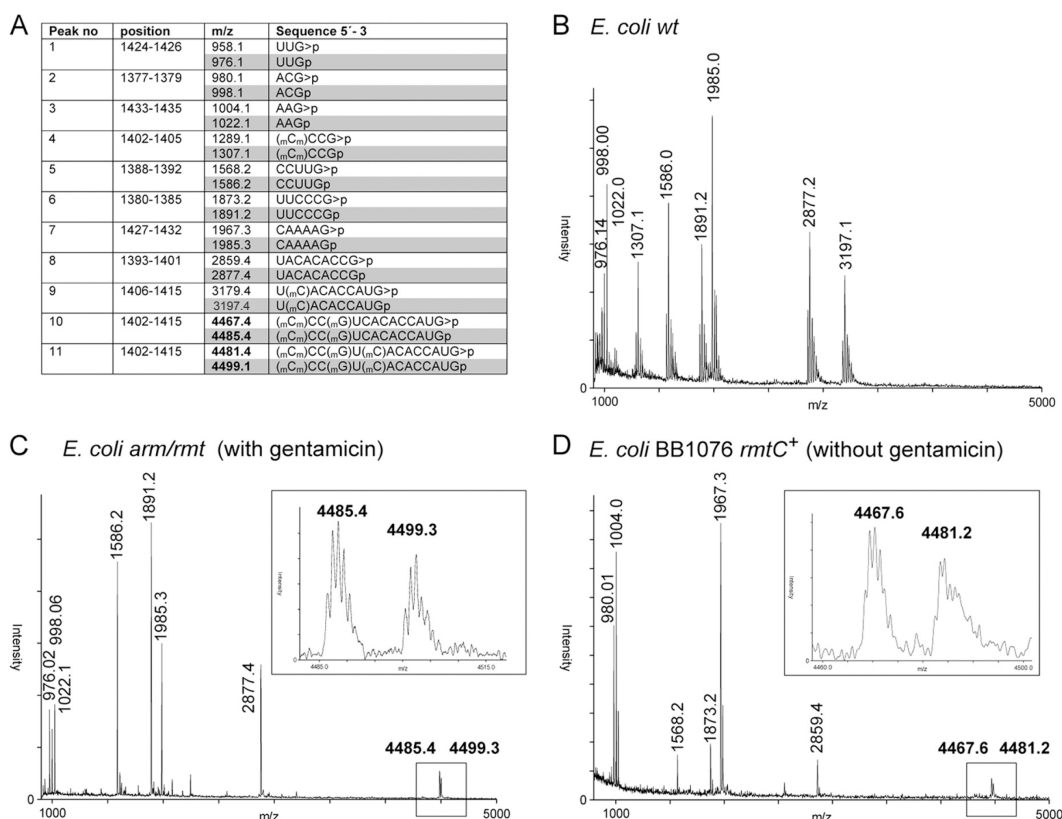
fragment protected by the deoxyoligonucleotide was isolated by gel electrophoresis (2). The rRNA fragment was digested at 37°C overnight in 2  $\mu$ l of 50 mM 3-hydroxyisobutyric acid containing 20 units of RNase T<sub>1</sub> (Roche). Samples were analyzed by MALDI MS (Voyager Elite; PerSeptive Biosystems) recording in reflector and positive-ion mode (22). Spectra were analyzed using the program *m/z* (Proteometrics, Inc.).

## RESULTS AND DISCUSSION

**The resistance methyltransferases ArmA, RmtB, and RmtC impede the RsmF housekeeping methylation.** The methylation site of the widely spread 16S rRNA methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides ArmA and RmtB has



Gutierrez et al.



**FIG 2** MALDI MS spectra of RNase T<sub>1</sub> oligonucleotides from the *E. coli* 16S rRNA sequence C1378 to G1432. (A) Theoretical monoisotopic masses of the RNase digestion products. Two different values for the same fragments are indicated, depending on whether they have 3'-end cyclic phosphates or are linear fragments (boxes in gray). Only fragments that are trinucleotides and larger are shown. The theoretical and empirical masses (given above the peaks) match to within 0.2 Da. (B to D) Corresponding spectra of rRNAs from *E. coli* BB1074 wt with *rsmF*, showing the fragments at *m/z* 1307 and 3197 (B), *E. coli* with *armA/rmtB* in the presence of aminoglycosides (C), and the *E. coli* BB1076 *rmtC*<sup>+</sup> insertion mutant in the absence of aminoglycosides (D). The experiments took place at different times in such a way that for *E. coli* BB1074 wt (B) and *E. coli* *arm/rmt* (C) we obtained fragments with the linear form and for the *E. coli* BB1076 *rmtC*<sup>+</sup> mutant (without gentamicin) (D) (experiment performed later) we obtained fragments with 3'-end cyclic phosphates. Panels C and D show essentially the same mass spectra, in which the fragments at *m/z* 1307 and 3197 are missing and remain combined in the longer sequences at *m/z* 4467/4485 when G1405 is methylated and 4481/4499 when both G1405 and C1407 are methylated. The enlargement of this spectral region shows the multiple tops in these fragments that reflect the natural distribution of <sup>12</sup>C and <sup>13</sup>C isotopes.

been shown to be m<sup>7</sup>G1405 (24, 28). Here, we performed MALDI mass spectrometry to identify whether the emerging aminoglycoside resistance Arm/Rmt methyltransferases found in *Enterobacteriaceae* also impede the housekeeping methylation at m<sup>5</sup>C1407. As expected, in the bacteria bearing either ArmA or RmtB, methylation at G1405 and C1407 was evident (Fig. 2). Interestingly, a second fragment, namely, 4485.4/4467.4 mCmCCGmUCACACCAUG was identified, in which the methyl group at position m<sup>7</sup>G1405 (boldface) was present but the housekeeping methyl group at position m<sup>5</sup>C1407 was absent. Thus, as shown for the sisomicin-gentamicin resistance methyltransferase from the sisomicin-producing actinomycete *Micromonospora zionensis* Sgm (7), Arm/Rmt methyltransferases from pathogenic bacteria reduce methylation at the adjacent rRNA nucleotide m<sup>5</sup>C1407. However, the biological significance of this phenomenon remains unexplored. We decided to study the fitness costs of 16S rRNA methyltransferases of the Arm/Rmt family and the RsmF (rRNA small-subunit methyltransferase) housekeeping methyltransferase, which is responsible for the m<sup>5</sup>C1407 methylation in *E. coli* (1).

To address this subject, we first analyzed the stability of the *rmtB* gene in *E. coli* when borne on a multicopy plasmid. As soon as 4 days after serial passages in the absence of selective pressure, only 20% of the cells still bore the *rmtB* gene, whereas the mock plasmid pTOPO remained present in all colonies tested (data not shown). Thus, further study of Arm/Rmt genes in high-copy-number plasmids was not optimal. In order to mimic natural conditions as much as possible and to assess the fitness cost of the resistance determinants without interference of plasmids, we decided not to artificially subclone these genes in other vectors or to use other antibiotics to maintain the plasmid stability. Instead, we took advantage of another 16S rRNA methyltransferase from pathogenic bacteria of the Arm/Rmt family, RmtC, that has recently been identified in enterobacteria in the United Kingdom (20) and the United States (13). In these clinical isolates, *rmtC* was located on the chromosome and transcribed from the constitutive promoter of the *ISEcp1* element located immediately upstream of *rmtC* (33). We integrated *rmtC* and its native promoter into the chromo-

some of *E. coli* BB1074 wt, giving rise to strain BB1076 *rmtC*<sup>+</sup>. The integration site of the construct was the *ygcE-ygcF* locus, which has recently been shown to be suitable for knock-in of genes into *E. coli* (23). MALDI mass spectrometry of BB1076 *rmtC*<sup>+</sup> showed that, as for ArmA and RmtB, RmtC methylation at m<sup>7</sup>G1405 impedes methylation of m<sup>5</sup>C1407 (Fig. 2).

**The RsmF housekeeping methylation contributes to aminoglycoside resistance in *E. coli*.** In order to assess the consequences of the loss of housekeeping methylation at m<sup>5</sup>C1407, the *rsmF* gene was deleted in frame in *E. coli* BB1074 wt, giving rise to BB1075  $\Delta$ *rsmF*. The growth curves of strains BB1074 wt and BB1075  $\Delta$ *rsmF* were indistinguishable, indicating that the loss of m<sup>5</sup>C1407 had no distinct effect on the growth kinetics of the bacterium. However, competition experiments offer a more discriminative and precise measurement of fitness, since they reflect the competitive disadvantage during all the phases of the growth cycle and in several consecutive cycles (27). Strains BB1074 wt and BB1075  $\Delta$ *rsmF* were grown in competition experiments, and the proportion of bacteria carrying the *rsmF* deletion was monitored every 24 h for 10 days. One hundred colonies were checked by PCR at each time point to determine the presence or absence of the *rsmF* gene. From day 2 on, a constant decrease in the proportion of the *rsmF* mutant strain was observed. At day 6, nearly all the colonies tested were BB1074 wt (Fig. 3). The selection coefficient (*s*) was established to estimate the difference in relative fitness between the strains in competition over the entire experiment. *E. coli* BB1075  $\Delta$ *rsmF* had a selection coefficient *s* of  $-0.0767$ , which means that it possesses a competitive disadvantage of ca. 7.7% per 10 generations relative to the parental strain *E. coli* BB1074 wt. As the methylation site of RsmF is adjacent to the binding site of aminoglycosides (Fig. 1), we hypothesized that BB1075  $\Delta$ *rsmF* could potentially possess an altered pattern of susceptibility to this family of antimicrobials. MIC measures with this strain compared to the parental strain revealed that the mutant BB1075  $\Delta$ *rsmF* was more resistant to kanamycin, tobramycin, gentamicin, neomycin, apramycin, and arbekacin (Table 1). These results reveal that the housekeeping methyltransferase RsmF is involved not only in the function of the ribosome but also in intrinsic susceptibility to aminoglycosides in *E. coli*. It is known that ring III of neomycin and kanamycin-like aminoglycosides as well as ring I of apramycin interact with N4 of the nucleotide C1407 (14, 18). The absence of the methyl group in the N5 position of C1407 seems to destabilize the contact between these aminoglycosides and the A site pocket, giving rise to an increase of resistance when the N7 1405 methylation is missing. The currently available crystal structures elucidate the involvement of RmtC methylation in the binding of these molecules to the aminoglycoside binding pocket of the 16S rRNA ribosome (Fig. 1).

**RmtC has no fitness cost in *E. coli*.** We have identified that the Arm/Rmt methyltransferases impede methylation by the endogenous methyltransferase RsmF at position m<sup>5</sup>C1407 and that the absence of this methylation affects aminoglycoside resistance and entails a strong fitness cost for the bacterium. We next questioned whether methylation at position m<sup>7</sup>G1405 by Arm/RmtB methyltransferases could compensate for the competitive disadvantage of losing *rsmF*. To assess this, the *rmtC* gene was integrated into the chromosome of the *rsmF* mutant strain BB1075  $\Delta$ *rsmF*, generating strain BB1077  $\Delta$ *rsmF rmtC*<sup>+</sup>. This strain was used in fitness competition experiments against the original wild-type bacterium with *rsmF*. The fitness cost of lacking *rsmF* but bearing

*rmtC* was 6% per 10 generations relative to the wild-type parental strain (Fig. 3). These results reveal that in the absence of *rsmF*, an acquired aminoglycoside resistance methyltransferase gene has no pronounced fitness cost.

To gain insight into the fitness cost of RmtC in a wild-type *E. coli* background, we then introduced the *rmtC* gene with its native promoter into the chromosome of the *E. coli* parental strain, creating BB1076 *rmtC*<sup>+</sup>. MICs of the corresponding 4,6-disubstituted deoxystreptamines gentamicin, kanamycin, and tobramycin and the Japanese aminoglycoside arbekacin increased to the levels for clinical isolates bearing RmtC (Table 1), showing that the gene was expressed as in pathogenic wild-type enterobacteria (20). BB1076 *rmtC*<sup>+</sup> and its parental strain BB1074 wt mimic the environmental situation, in which *E. coli* becomes resistant to these clinically relevant aminoglycosides through acquisition of an Arm/Rmt methyltransferase. In the presence of antibiotics, it is evident that acquisition of the resistance gene is an evolutionary advantage for the bacterium. However, when the antimicrobial pressure disappears, e.g., when therapy is stopped, the fitness burden of resistance is in most cases so high that the antimicrobial resistance determinants are diluted in the bacterial population. In order to be able to predict whether Arm/Rmt genes would be counterselected in the absence of antibiotic pressure, competition experiments between the BB1074 wt and BB1076 *rmtC*<sup>+</sup> were performed. Surprisingly, and contrary to the accepted idea that the fitness burden of antimicrobial resistance is high, the competitive disadvantage of bearing the *rmtC* gene was only 0.39% per 10 generations, showing that *rmtC* has a negligible fitness cost in *E. coli*.

Finally, to assess the effect of RmtC in the absence of the housekeeping RsmF methyltransferase, competition experiments were performed between strains BB1075  $\Delta$ *rsmF* and BB1077  $\Delta$ *rsmF rmtC*<sup>+</sup>. Interestingly, the fitness cost of RmtC was again only 0.69% per 10 generations, showing that the clash with the housekeeping methyltransferase RsmF does not influence the fitness cost entailed by RmtC (Fig. 3). However, the MIC of strain BB1077  $\Delta$ *rsmF rmtC*<sup>+</sup> was overall higher for the 4,6-disubstituted deoxystreptamines gentamicin, kanamycin, tobramycin and arbekacin than that of the parental *E. coli* BB1076 *rmtC*<sup>+</sup> (Table 1). The difference in the MICs for strains BB1076 *rmtC*<sup>+</sup> and BB1077  $\Delta$ *rsmF rmtC*<sup>+</sup> is due to the effect of RsmF on aminoglycoside resistance that we describe here, since this increment in resistance is also observed between *E. coli* BB1074 wt and BB1075  $\Delta$ *rsmF*.

**RmtC methylates m<sup>7</sup>G1405 in the presence and absence of aminoglycosides.** Since RmtC, like Sgm, in the presence of aminoglycosides impedes methylation at the N5 position of nucleotide C1407 when the N7 position of G1405 is methylated, we further questioned what would happen in the absence of antibiotics. Our model with the chromosomal *rmtC* gene is ideal to answer this question. We thus performed MALDI mass spectrometry experiments with total rRNA extracted from ribosomal particles from the strain BB1076 *rmtC*<sup>+</sup> that had been grown in the presence and absence of gentamicin. Interestingly, in both experimental scenarios, the residue m<sup>7</sup>G1405 was always methylated, whereas the methylation in m<sup>5</sup>C1407 was impeded in both cases (Fig. 2). These results unequivocally demonstrate that RmtC has high affinity for methylation of m<sup>7</sup>G1405 and clashes with the housekeeping modification enzyme RsmF. This experiment shows how effectively a resistance methyltransferase that has been

Gutierrez et al.

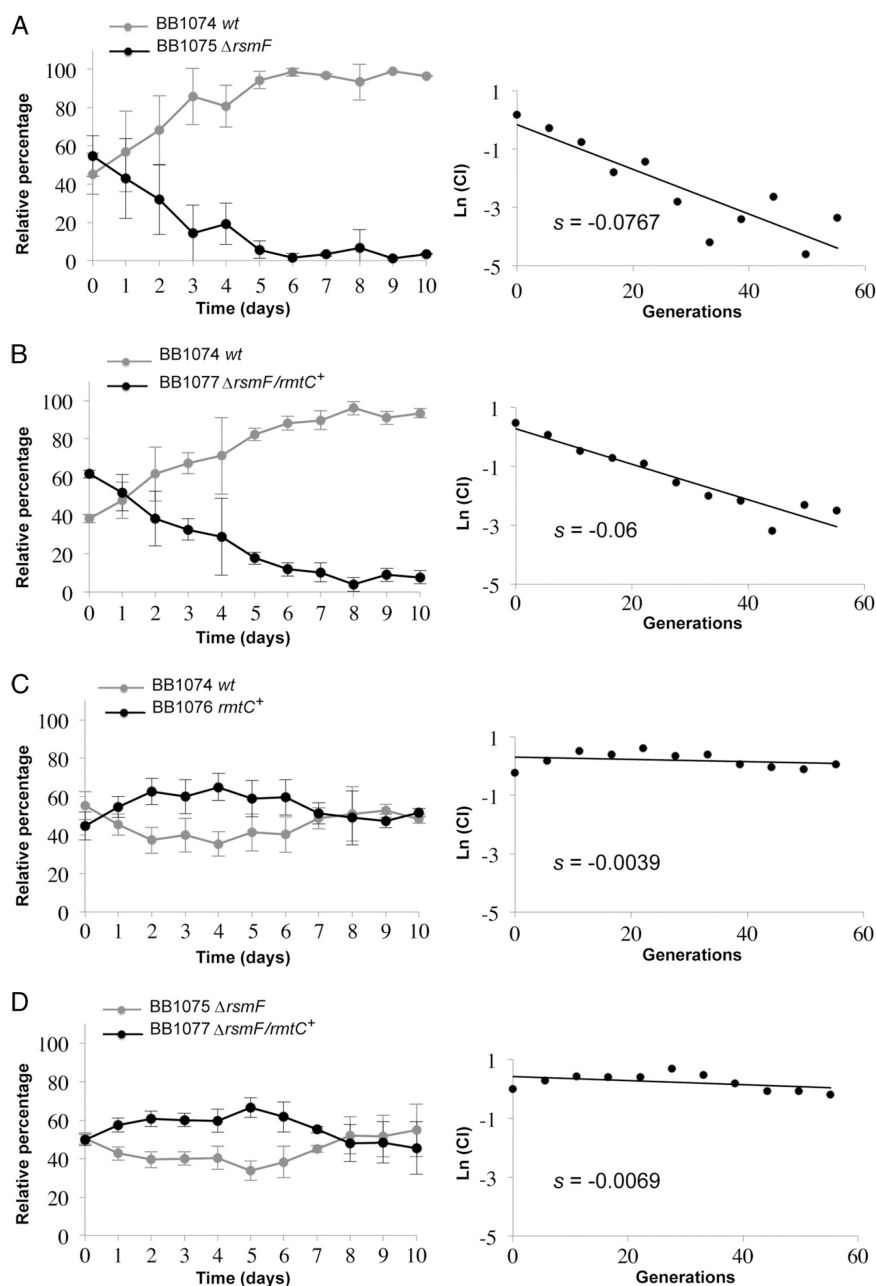


FIG 3 Fitness cost of RsmF and RmtC in different backgrounds. Growth competition curves between BB1074 wt and BB1075  $\Delta rsmF$  (A), BB1074 wt and BB1077  $\Delta rsmF rmtC^+$  (B), BB1074 wt and BB1076  $rmtC^+$  (C), and BB1075  $\Delta rsmF$  and BB1077  $\Delta rsmF rmtC^+$  (D) are shown. Competition curves were constructed with the averages from three independent experiments. The selection coefficient ( $s$ ) was calculated from the competition experiment.  $s$  is the slope of the linear regression model  $\ln(CI)/\ln(d)$ , where  $CI$  is the ratio of the CFU of the resistant and susceptible populations at  $t_1$  divided by the same ratio at  $t_0$  and where  $d$  is the dilution factor.

acquired as an exogenous genetic element can elbow aside the cell's own housekeeping methyltransferases to gain access to its target.

Thus, acquisition of an aminoglycoside resistance methyl-

transferase modifies the methylation pattern in the 16S rRNA but does not entail a major fitness cost for the host bacterium. This means that the evolution of the ribosome toward resistance implies complex counterintuitive phenomena that ultimately lead to



TABLE 1 Aminoglycoside susceptibilities of *E. coli* with and without *rsmF* and/or *rmtC*

Aminoglycoside	MIC ( $\mu$ g/ml) for strain:			
	BB1074 wt	BB1075 $\Delta$ <i>rsmF</i>	BB1076 <i>rmtC</i> <sup>+</sup>	B1077 $\Delta$ <i>rsmF</i> <i>rmtC</i> <sup>+</sup>
4,6-Disubstituted 2-deoxystreptamines				
Gentamicin	0.25	0.5	128	256
Kanamycin	1	2	512	1,024
Tobramycin	0.25	0.5	64	128
Arbekacin	1	2	256	512
4,5-Disubstituted 2-deoxystreptamine neomycin	1	2	1	2
4-Substituted 2-deoxystreptamine apramycin	4	8	4	8

selection and maintenance of resistance even in the absence of selective pressure.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Natalia Montero for excellent technical assistance and Elisabeth Diago-Navarro for excellent assistance with MacPyMol. We thank Y. Arakawa for providing the *rmtB* gene.

We thank the Universidad Complutense de Madrid for a Ph.D. scholarship to B.G., the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) for supporting Ph.D. scholarships to L.C. and C.M.O., and the Comunidad de Madrid for a scholarship to L.H. This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO 2010-20204, PRI-PIBIN-2011-0915, and BFU2011-14145-E), the EU FP7 Health Project EvoTAR, TRAIN-ASAP, and the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009 AGR/4189 of the Comunidad de Madrid (Spain).

## REFERENCES

- Andersen NM, Douthwaite S. 2006. YebU is a m<sup>5</sup>C methyltransferase specific for 16S rRNA nucleotide 1407. *J. Mol. Biol.* 359:777–786.
- Andersen TE, Porse BT, Kirpekar F. 2004. A novel partial modification at C2501 in *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *RNA* 10:907–913.
- Baba T, et al. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2:1–8.
- Basturea GN, Rudd KE, Deutscher MP. 2006. Identification and characterization of RsmE, the founding member of a new RNA base methyltransferase family. *RNA* 12:426–434.
- Cherepanov PP, Wackernagel W. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9–14.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th ed. Approved standard M100–S19. CLSI, Wayne, PA.
- Cubriilo S, Babić F, Douthwaite S, Maravić Vlahovick G. 2009. The aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm impedes RsmF methylation at an adjacent rRNA nucleotide in the ribosomal A site. *RNA* 15:1492–1497.
- Cundliffe E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:207–233.
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:6640–6645.
- Davis MA, et al. 2010. Discovery of a gene conferring multiple aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2666–2669.
- Doi Y, et al. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:491–496.
- Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. 2007. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:852–856.
- Folster JP, Rickert R, Barzilay EJ, Whichard JM. 2009. Identification of the aminoglycoside resistance determinants *armA* and *rmtC* among non-Typhi *Salmonella* isolates from humans in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4563–4564.
- François B, Russell RJM, Murray JB, Aboull-ela, Masquida FB, Vicens Q, Westhof E. 2005. Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res.* 33:5677–5690.
- Galimand M, Courvalin P, Lambert T. 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2565–2571.
- Gonzalez-Zorn B, et al. 2005. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 11:954–956.
- Granier SA, et al. 2011. ArmA methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5262–5266.
- Han Q, et al. 2005. Molecular recognition by glycoside pseudo base pairs and triples in an apramycin-RNA complex. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44:2694–2700.
- Helser TL, Davies JE, Dahlberg JE. 1972. Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. *Nat. New Biol.* 235:6–9.
- Hopkins KL, Escudero JA, Hidalgo L, Gonzalez-Zorn B. 2010. 16S rRNA methyltransferase RmtC in *Salmonella enterica* serovar Virchow. *Emerg. Infect. Dis.* 16:712–715.
- Kimura S, Suzuki T. 2010. Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 38:1341–1352.
- Kirpekar F, Douthwaite S, Roepstorff P. 2000. Mapping posttranscriptional modifications in 5S ribosomal RNA by MALDI mass spectrometry. *RNA* 6:296–306.
- Kuhlman TE, Cox EC. 2010. Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs. *Nucleic Acids Res.* 38:e92.
- Liou GF, Yoshizawa S, Courvalin P, Galimand M. 2006. Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *J. Mol. Biol.* 359:358–364.
- Ofengand J, Del Campo M. 29 December 2004. Chapter 4.6.1, Modified nucleosides in *Escherichia coli* ribosomal RNA. In Curtiss R (ed), *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC. doi:10.1128/ecosal.4.6.1.
- Ogle JM, Ramakrishnan V. 2005. Structural insights into translational fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 74:129–177.
- San Millan A, et al. 2010. *Haemophilus influenzae* clinical isolates with plasmid pB1000 bearing *bla*<sub>ROB-1</sub>: fitness cost and interspecies dissemination. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1506–1511.
- Schmitt E, Galimand M, Panvert M, Courvalin P, Mechulam Y. 2009. Structural bases for 16S rRNA methylation catalyzed by ArmA and RmtB methyltransferases. *J. Mol. Biol.* 388:570–852.
- Shandrick S, et al. 2004. Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43:3177–3182.
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57:138–163.
- Snyder L, Champness W. 2007. Molecular genetics of bacteria, p. 208–209. ASM Press, Washington, DC.
- Vicens Q, Westhof E. 2003. RNA as a drug target: the case of aminoglycosides. *ChemBiochem* 4:1018–1023.
- Wachino J, et al. 2006. Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by *ISEcp1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3212–3215.
- World Health Organization. 2007. Critically important 1 antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use: report of the second WHO expert meeting, 29–31 May 2007, Copenhagen, Denmark. World Health Organization, Geneva, Switzerland. [http://www.who.int/foodborne\\_disease/resistance/antimicrobials\\_human.pdf](http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf).
- Yokoyama K, et al. 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362:1888–1893.
- Zhang W, Dunkle JA, Cate JH. 2009. Structures of the ribosome in intermediate states of ratcheting. *Science* 325:1014–1017.





## ***II. Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs.***

Los aminoglucósidos siguen siendo el tratamiento de elección para infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, particularmente en complicaciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística. Estudios previos han demostrado en otras bacterias que los aminoglucósidos tienen su diana primaria en la region decodificante en la hélice 44 del ARNr 16S y una diana secundaria en la hélice 69 del ARNr 23S. Las hélices 44 y 45 contienen modificaciones intrínsecas en m<sup>4</sup>Cm1402, m<sup>3</sup>U1498, m<sup>2</sup>G1516, m<sub>6</sub><sup>2</sup>A1518 y m<sub>6</sub><sup>2</sup>A1519; la hélice 69 está modificada en m<sup>3</sup>Ψ1915 así como los nucleótidos adyacentes m<sup>5</sup>U1939 y m<sup>5</sup>C1962. Todas las modificaciones están cerca de la estequiometría con la excepción de m<sup>3</sup>Ψ1915, en donde aproximadamente un 80% de las moléculas están metiladas. El estatus de una cepa clínica patógena que expresa la metiltransferasa adquirida RmtD se ha visto alterado en dos importantes aspectos: RmtD modica de forma estequiométrica el residuo m<sup>7</sup>G1405 e impide a su vez una de las metilaciones intrínsecas ocurridas en el nucleótido C1402. El mapeo de las metilaciones en los ARNrs de *P. aeruginosa* es un paso esencial hacia el entendimiento de la arquitectura de los sitios de unión a los aminoglucósidos y al diseño racional de antibióticos para hacer frente a este patógeno bacteriano.



# Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs

Belen Gutierrez<sup>1,2</sup>, Stephen Douthwaite<sup>3</sup>, and Bruno Gonzalez-Zorn<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Sanidad Animal; Facultad de Veterinaria; Universidad Complutense de Madrid; Madrid, Spain; <sup>2</sup>Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET); Universidad Complutense de Madrid; Madrid, Spain; <sup>3</sup>Department of Biochemistry & Molecular Biology; University of Southern Denmark; Odense, Denmark

**Keywords:** pseudomonas, rRNA modifications, methyltransferases, aminoglycosides, RmtD

**Abbreviations:** MALDI-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry; rRNA, ribosomal RNA; H44, helix 44; H69, helix 69; H45, helix 45; 2-DOS, 2- deoxystreptamines; MIC, minimal inhibitory concentration

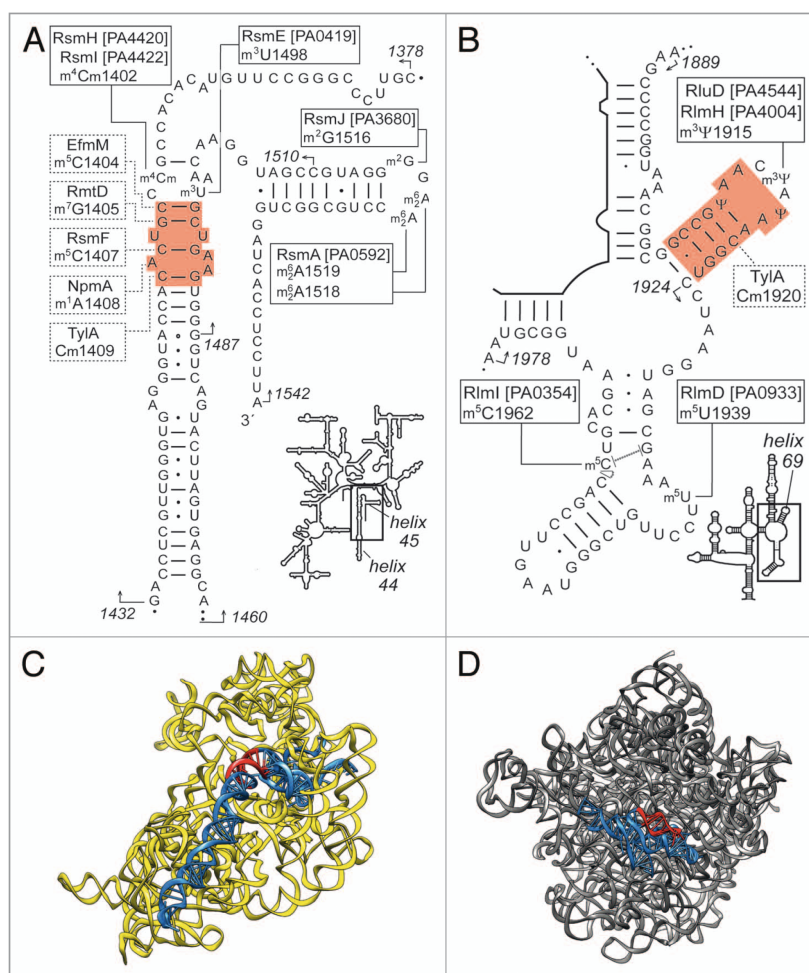
Aminoglycoside antibiotics remain the drugs of choice for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections, particularly for respiratory complications in cystic-fibrosis patients. Previous studies on other bacteria have shown that aminoglycosides have their primary target within the decoding region of 16S rRNA helix 44 with a secondary target in 23S rRNA helix 69. Here, we have mapped *P. aeruginosa* rRNAs using MALDI mass spectrometry and reverse transcriptase primer extension to identify nucleotide modifications that could influence aminoglycoside interactions. Helices 44 and 45 contain indigenous (housekeeping) modifications at m<sup>4</sup>Cm1402, m<sup>3</sup>U1498, m<sup>2</sup>G1516, m<sup>6</sup>A1518, and m<sup>6</sup>A1519; helix 69 is modified at m<sup>3</sup>Ψ1915, with m<sup>5</sup>U1939 and m<sup>5</sup>C1962 modification in adjacent sequences. All modifications were close to stoichiometric, with the exception of m<sup>3</sup>Ψ1915, where about 80% of rRNA molecules were methylated. The modification status of a virulent clinical strain expressing the acquired methyltransferase RmtD was altered in two important respects: RmtD stoichiometrically modified m<sup>7</sup>G1405 conferring high resistance to the aminoglycoside tobramycin and, in doing so, impeded one of the methylation reactions at C1402. Mapping the nucleotide methylations in *P. aeruginosa* rRNAs is an essential step toward understanding the architecture of the aminoglycoside binding sites and the rational design of improved drugs against this bacterial pathogen.

## Introduction

Aminoglycosides are a group of broad-spectrum antibiotics that are widely used against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The aminoglycoside tobramycin has found extensive application in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections, particularly for cystic fibrosis patients where this Gram-negative pathogen is a frequent cause of pulmonary complications.<sup>1</sup> Over 60% of cystic fibrosis patients are chronically infected with *P. aeruginosa* by the age of 20.<sup>2</sup> Treatment with tobramycin prolongs life expectancy, although the drug has a mainly palliative role reducing the intensity of infections without measurable success at eradicating them.<sup>3</sup> For want of better therapeutics, however, aminoglycosides will undoubtedly retain an important role in the immediate future.<sup>4</sup> Treatment is generally via tobramycin inhalation,<sup>5</sup> and recent improvements in therapy have been confined to the drug delivery systems. Clearly, more effective aminoglycosides are now required and any rational development of these compounds will require a thorough understanding of the rRNA targets. The rRNAs of *P. aeruginosa* have previously remained uncharted territory.

Aminoglycoside antibiotics, including tobramycin, exert their antimicrobial effects by disturbing protein synthesis on the bacterial ribosome.<sup>6,7</sup> There are two sites of aminoglycoside interaction on the ribosome, and the primary drug target is at the mRNA decoding region on the 30S ribosomal subunit (Fig. 1A). Here, aminoglycosides interact with highly conserved nucleotides at the ribosomal A site of 16S rRNA helix 44 (H44) where codon–anticodon interactions are monitored.<sup>8–12</sup> Drug interaction here causes loss of translational fidelity, the accumulation of erroneous proteins and, ultimately, bacterial death.<sup>6,13</sup> Recently, a second aminoglycoside site was discovered within another functionally important region on the 50S ribosomal subunit in helix 69 (H69) of 23S rRNA.<sup>14,15</sup> H69 interacts with H44 to form interbridge B2a at the interface of the two subunits.<sup>16</sup> Subsequent to termination of mRNA translation,<sup>17</sup> ribosome recycling factor binds to this interbridge and, in conjunction with elongation factor G, dissolves the H69–H44 interaction enabling the two ribosomal subunits to separate. Aminoglycoside binding within H69 (Fig. 1B) stabilizes the interbridge contacts and interferes with the subunit recycling process.<sup>14,18</sup>

\*Correspondence to: Bruno Gonzalez-Zorn; Email: bgzorn@ucm.es  
Submitted: 06/27/2013; Revised: 07/26/2013; Accepted: 07/31/2013  
<http://dx.doi.org/10.4161/rna.25984>



**Figure 1.** Aminoglycoside binding-sites (red) within the rRNAs of *P. aeruginosa*. **(A)** Helices 44 and 45 of 16S rRNA showing the indigenous housekeeping methylations mapped in this study at m<sup>4</sup>Cm1402, m<sup>3</sup>U1498, m<sup>7</sup>G1516, m<sup>6</sup>A1518, and m<sup>6</sup>A1519, together with the respective enzymes and *P. aeruginosa* gene loci (unbroken lines and boxes). The acquired methylation catalyzed by RmtD at m<sup>7</sup>G1405 (dashed lines and boxes) confers tobramycin resistance. Modifications seen in other bacteria (but not in *P. aeruginosa*) together with the associated methyltransferases include: m<sup>5</sup>C1404 catalyzed by EfmM<sup>33</sup>; m<sup>5</sup>C1407 by RsmF<sup>22</sup>; m<sup>1</sup>A1408 by NpmA<sup>38</sup>; and Cm1409 by TlyA<sup>43</sup> and are also indicated by dashed lines. **(B)** Modification at m<sup>3</sup>Ψ1915 within the loop of 23S rRNA helix 69, and in neighboring structures at m<sup>5</sup>U1939 and m<sup>5</sup>C1962; *P. aeruginosa* lacks TlyA and, thus, the second target of this enzyme at C1920 is unmodified. Uridine isomerisation is mass neutral and the Ψ1911 and Ψ1917 modifications remain putative. Start and end points of the oligos used for rRNA isolation and MS analyses are shown by the arrows. **(C)** Positions of helices 44 and 45 (blue) with the aminoglycoside site highlighted (red) on the 16S rRNA tertiary structure (redrawn from PDB file 3I1M of the *E. coli* 30S subunit with r-proteins removed). **(D)** Helix 69 (red) with the surrounding 23S rRNA sequences in blue (redrawn from 3I1P, *E. coli* 50S subunit with r-proteins removed).

Helices 44 and 69 and adjacent rRNA sequences are targeted by several nucleotide modification enzymes, consistent with the notion that modifications tend to occur in rRNA regions that are of primary functional importance.<sup>19,20</sup> The sites of the indigenous (housekeeping) modifications have been comprehensively mapped within *Escherichia coli* rRNAs, and consist of 11

modified nucleotides in 16S rRNA and 25 in 23S rRNA. Housekeeping modifications are added within H44 by the methyltransferases RsmH and RsmI at nucleotide m<sup>4</sup>Cm1402,<sup>21</sup> by RsmF at m<sup>5</sup>C1407,<sup>22</sup> and by RsmE at m<sup>3</sup>U1498.<sup>23</sup> Within the loop of the adjacent 16S rRNA helix H45, m<sup>2</sup>G1516 is modified by RsmJ,<sup>24</sup> and m<sup>6</sup>A1518 and m<sup>6</sup>A1519 by RsmA.<sup>25,26</sup> At the second aminoglycoside side in H69 of 23S rRNA, three uridine isomerizations are introduced in the loop by the enzyme RluD to form Ψ1911, Ψ1915, and Ψ1917<sup>19</sup> and Ψ1915 is then methylated at the N3-position by RlmH.<sup>27,28</sup> Other methylations in the same region at nucleotides m<sup>5</sup>U1939 and m<sup>5</sup>C1962 are catalyzed by RlmD<sup>29,30</sup> and by RlmI,<sup>31</sup> respectively. Orthologs of some of the genes encoding these modification enzymes are evident in other Gram-negative bacteria.<sup>32</sup>

In addition to the enzymes that add the rRNA housekeeping modifications, several other methyltransferases modify 16S rRNA H44, and in doing so confer resistance to aminoglycosides. Such is the case with methylation at m<sup>5</sup>C1404,<sup>33</sup> m<sup>7</sup>G1405, and m<sup>1</sup>A1408 (Fig. 1A). Methyltransferases directing the latter two modifications are more prevalent in clinical pathogens and show similarity to enzymes originally identified in aminoglycoside-producing actinomycetes.<sup>34,35</sup> The m<sup>7</sup>G1405 methyltransferases include ArmA and RmtA-RmtH,<sup>36–39</sup> and confer high-level resistance to 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamines (2-DOS) aminoglycosides, including tobramycin; the m<sup>1</sup>A1408 methyltransferases include NpmA, and these enzymes confer resistance to both 4,5-disubstituted 2-DOS and 4,6-disubstituted 2-DOS aminoglycosides.<sup>40</sup>

Recently, the *rmtD* methyltransferase gene was shown to be prevalent in clinical isolates of *P. aeruginosa* that

are highly resistance to tobramycin.<sup>41</sup> Here, we map the housekeeping modifications within the aminoglycoside binding sites of 16S and 23S rRNAs from the aminoglycoside-sensitive *P. aeruginosa* strain PAO1 and a resistant clinical strain containing *rmtD*. We address the questions as to whether any of the housekeeping modifications could affect drug binding at either of the

**Table 1.** Modified nucleotides within the aminoglycoside binding sites of 16S and 23S rRNAs

	rRNA modification	E. coli genes encoding/modifying enzymes		Reference for E. coli	Putative PAO1 genes encoding modifyin enzymes	% ID PAO1	% G+C content of gene orthologs	
		Name	Synonym(s)				E. coli	PAO1
16S rRNA								
1402	m <sup>4</sup> C	rsmH	mraW	21	PA4420	53.3	55.6	64.4
1402	Cm	rsmI	yraL	21	PA4422	58.3	54.6	67.4
1407	m <sup>5</sup> C	rsmF	yebU	22	no	no	51.8	no
1498	m <sup>3</sup> U	rsmE	yggJ	23	PA0419	46.1	53.0	71.2
1516	m <sup>2</sup> G	rsmJ	yhiQ	24	PA3680	43.3	58.2	71.4
1518, 1519	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	rsmA	ksgA	25, 26	PA0592	48.3	53.0	66.0
23S rRNA								
1911, 1915, 1917	Ψ	rluD	yfil	19	PA4544	54.6	52.8	66.9
1915	m <sup>3</sup> Ψ	rlmH	ybeA	27, 28	PA4004	53.8	58.5	68.6
1939	m <sup>5</sup> U	rlmD	ygcA, rumA	29, 30	PA0933	36.5	51.5	67.1
1962	m <sup>5</sup> C	rlmI	yccW	31	PA0354	33.5	51.8	67.4

Putative methyltransferases were identified in silico in the genome of *P. aeruginosa* strain PAO1 by their similarity to the *E. coli* enzymes (gene annotations shown here). The percentages of identical amino acids in the encoded enzymes are indicated (% ID PAO1). The G–C base-pair content is given for each gene (% G+C), and can be compared with the overall G–C content within the *E. coli* genome (50.8%) and the *P. aeruginosa* PAO1 genome (66.6%). no, no orthologous gene.

aminoglycoside sites, and whether the acquisition of RmtD activity hindered any of the indigenous methyltransferases in gaining access to their nucleotide targets.

## Results and Discussion

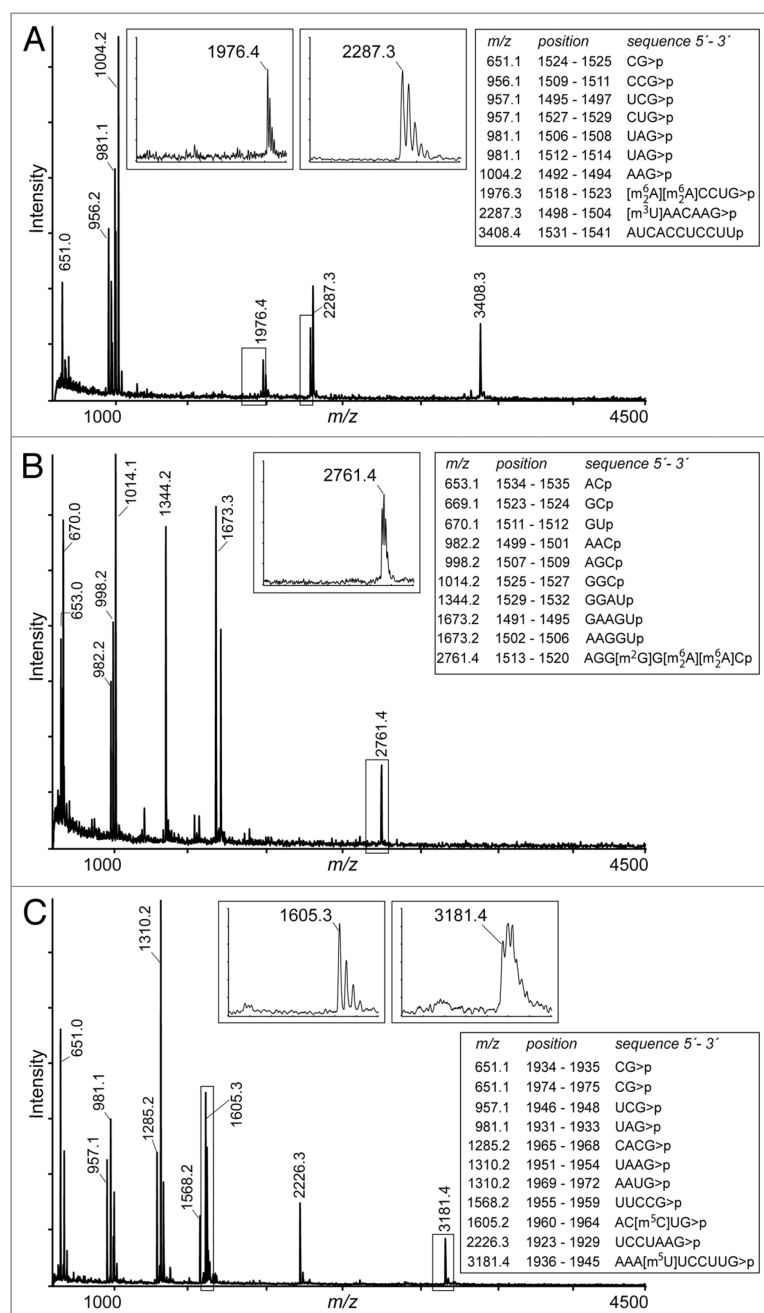
**Modifications at 16S rRNA nucleotides m<sup>4</sup>Cm1402, m<sup>3</sup>U1498, m<sup>2</sup>G1516, m<sup>6</sup><sub>2</sub>A1518, and m<sup>6</sup><sub>2</sub>A1519.** The *P. aeruginosa* PAO1 genome contains genes for several enzymes that share significant similarity with characterized *E. coli* rRNA methyltransferases (Table 1). To ascertain whether the PAO1 orthologs are expressed and do in fact modify the main aminoglycoside binding site at the decoding region of 16S rRNA, this region was analyzed using MALDI-MS and reverse transcriptase primer extension.

The sequences 1460–1510 and 1487–1542, which make up H45 and the 3'-portion of the decoding site in H44, were shown to contain several methylated nucleotides. The MS spectra clearly showed the presence of m<sup>6</sup><sub>2</sub>A1518 and m<sup>6</sup><sub>2</sub>A1519 in the RNase T1 fragment [m<sup>6</sup><sub>2</sub>A][m<sup>6</sup><sub>2</sub>A]CCUG (A1518-G1523) at *m/z* 1976 (Fig. 2A), as well as in the RNase A fragment AGG[m<sup>2</sup>G]G[m<sup>6</sup><sub>2</sub>A][m<sup>6</sup><sub>2</sub>A]C (A1513-C1520) at *m/z* 2761 (Fig. 2B). There

was no evidence of peaks with masses that were smaller by multiples of 14 Da (indicating a proton rather than a methyl group), and it was concluded from this that both A1518 and A1519 were completely (stoichiometrically) dimethylated. These modifications are added in *E. coli* by RsmA (KsgA)<sup>25,26</sup> at a late assembly stage of the 30S ribosomal subunit,<sup>42</sup> and are presumably mediated in the same manner by the homologous *P. aeruginosa* enzyme encoded by the PA0592 gene (Table 1). The *m/z* 2761 peak also contained stoichiometric amounts of a fifth methyl group that was mapped to nucleotide G1516. Modification at m<sup>2</sup>G1516 is catalyzed on the *E. coli* 30S subunit by RsmJ,<sup>24</sup> and the homologous enzyme is presumably encoded by PA3680 in *P. aeruginosa*.

Screening the sequence between H44 and H45 by primer extension produced an intense stop band indicating the presence of a modification on nucleotide U1498 (Fig. 3A). Methylation at the 5-position of the uracil or 2'-O of the ribose could be excluded, as these would have respectively resulted in either no stop or merely a partial pausing of reverse transcription,<sup>43</sup> so it was concluded that this modification was m<sup>3</sup>U1498. The level of m<sup>3</sup>U modification was quantified as being > 97% (Fig. 3A). The primer extension data was fully consistent with the MS analyses





**Figure 2.** MALDI-MS analyses of the amino-glycoside sites within *P. aeruginosa* rRNAs. **(A)** RNase T1 digestion products of the 16S rRNA sequence G1487 to A1542 reveals the dimethylated adenosines m<sup>2</sup>A1518 and m<sup>6</sup>A1519 in the m/z 1976 peak. The lack of significant peaks smaller by multiples of 14 Da (box) indicates that addition of these four methyl groups by RsmA is essentially stoichiometric. The m<sup>3</sup>U1498 modification is seen in the m/z 2287 peak, and is also stoichiometric. Masses are shown for the 2'-3'-cyclic phosphate fragments (>P) with the exception of the 3'-fragment (m/z 3408) where the ultimate adenosine A1542 was missing. **(B)** RNase A analysis of the same sequence. The two adenosines m<sup>2</sup>A1518 and m<sup>6</sup>A1519 are in the m/z 2761 peak with m<sup>2</sup>G1516; all five methylations are stoichiometric (box). Masses are with a linear (hydrated) 3'-phosphate (p). **(C)** RNase T1 digestion products of the 23S rRNA sequence C1924 to G1978. Nucleotide m<sup>5</sup>C1962 migrates in the fragment at m/z 1605, and m<sup>5</sup>U1939 at m/z 3181. Enlargements of these regions (boxes) show that methylation reactions by RlmI and RlmD, respectively, are close to complete. Spectra from these rRNA regions of *P. aeruginosa* strains BB1285 and PAO1 (with and without RmtD) were indistinguishable. The theoretical (boxed) and empirical masses (on peaks) matched to within 0.2 Da.

In the 1378–1432 region, two modifications were observed at nucleotide C1402 and these were shown to be equivalent to those added by the *E. coli* N<sup>6</sup>-methyltransferase RsmH and the 2'-O-methyltransferase RsmI.<sup>21</sup> The peak from the *P. aeruginosa* rRNA at m/z 1307 corresponds to the fragment [m<sup>4</sup>Cm]CCG (C1402-G1405), and both methylations appear to be stoichiometric, with no peaks at m/z 1279 or m/z 1293 (Fig. 4A). The genes encoding the *P. aeruginosa* RsmH/RsmI methyltransferases in are listed in Table 1. No other modifications were evident in the H44 and H45 regions of the *P. aeruginosa* 16S rRNA.

*P. aeruginosa* lacks a homolog of RsmF that modifies m<sup>5</sup>C1407 in *E. coli* 16S rRNA. The *P. aeruginosa* fragment UCACACCAUG (U1406-G1415) contains no modification, and flew at m/z 3183 (Fig. 4). Thus, the m<sup>5</sup>C1407 modification added in *E. coli* rRNA by the housekeeping methyltransferase RsmF<sup>22</sup> is absent in *P. aeruginosa*. Consistent with this, no *rsmF* homolog could be identified in the *P. aeruginosa* PAO1 genome (Table 1). This gene is conserved in the *Enterobacteriaceae* including *Salmonella*, *Klebsiella*, and *Shigella* homologs with > 80% amino acid identity; other Orders, including Aeromonadales, Alteromonadales, and Vibrionales, contain ORFs that are around 58% identical to RsmF. A dendrogram

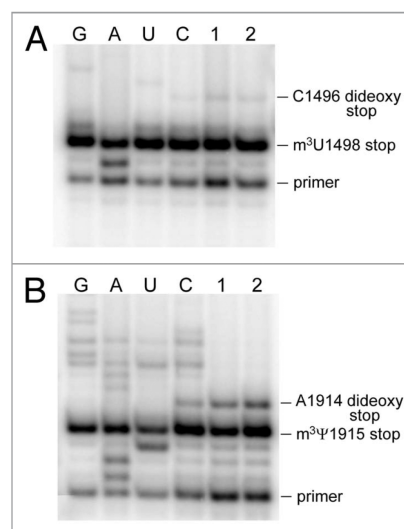
where the U1498-G1504 sequence flew exclusively at m/z 2287, corresponding to [m<sup>3</sup>U]AACAAG, with no evidence of an unmethylated fragment at m/z 2273 (Fig. 2A). The m<sup>3</sup>U1498 modification is added by RsmE in *E. coli*<sup>23</sup> and requires a fully assembled 30S subunit as a substrate for methylation.<sup>44</sup> The equivalent methyltransferase would be encoded by PA0419 in *P. aeruginosa*.

for genetic similarity in Gammaproteobacteria shows that those bacteria lacking RsmF are genetically related, while the bacteria possessing RsmF also cluster together. Thus, RsmF seems to have an early origin during speciation of Gram-negative bacteria in prokaryotes, and has been lost in *P. aeruginosa* most likely through a single deletion event in a common ancestor (Fig. S1). Also absent in *P. aeruginosa* is the 2'-*O*-methyltransferase TlyA, which modifies nucleotide C1409 in 16S rRNA and C1920 in 23S rRNA (Fig. 1) and is linked with capreomycin resistance in mycobacteria.<sup>45</sup>

**Modifications at 23S rRNA nucleotides m<sup>3</sup>Ψ1915, m<sup>5</sup>U1939, and m<sup>5</sup>C1962.** Screening the *P. aeruginosa* genome in silico revealed several candidates for genes encoding enzymes that might modify the secondary aminoglycoside binding site within H69 of 23S rRNA. These included the gene encoding the pseudouridine synthase RluD, which isomerizes the 23S rRNA nucleotides U1911, U1915 and U1917 in the *E. coli* helix 69 loop.<sup>17,46</sup> Nucleotide Ψ1915 is subsequently methylated by RlmH to form m<sup>3</sup>Ψ1915,<sup>27,28</sup> and RlmH activity has been shown to be dependent on prior RluD-catalyzed isomerization of this nucleotide.<sup>28</sup> Species analyzed thus far have been shown to possess an RlmH ortholog only when accompanied by an RluD ortholog. *P. aeruginosa* is no exception, and possesses both of these enzymes, respectively, encoded by PA4004 and PA4544. Methylation of the *P. aeruginosa* rRNA was indicated by the strong primer extension stop before Ψ1915 (Fig. 3B), consistent with the RlmH-directed m<sup>3</sup>Ψ modification. The level of methylation at this nucleotide (no more than 80% of rRNA molecules) appears to reflect a mode of substrate recognition similar to that seen in *E. coli*, where RluD methylates Ψ1915 only after association of the newly assembled 50S subunit into the 70S ribosome complex.<sup>28</sup>

Putative gene homologs encoding the methyltransferases RlmD and RlmI were also evident in *P. aeruginosa*, which in *E. coli* are responsible for methylation at m<sup>5</sup>U1939<sup>29</sup> and m<sup>5</sup>C1962,<sup>31</sup> respectively. MALDI-MS spectra of RNase T1 digestion products showed that a methyl group was present on C1962 in the fragment AC[m<sup>5</sup>C]UG (A1960-G1964) at *m/z* 1605 and on U1939 in the fragment AAA[m<sup>5</sup>U]UCCUUG (A1936-G1845) at *m/z* 3181 (Fig. 2C). Enlargements of these spectral regions show only trace amounts of products with 14 Da lower mass (*m/z* 1591 and 3167), indicating that methylation at these targets is almost complete. No other modifications were evident in this region of the *P. aeruginosa* 23S rRNA. The predictions of modification enzymes made in silico matched the empirical data—all the rRNA modifications predicted by the search were shown to occur and, conversely, there were no modifications at sites where enzymes were predicted to be absent (Table 1).

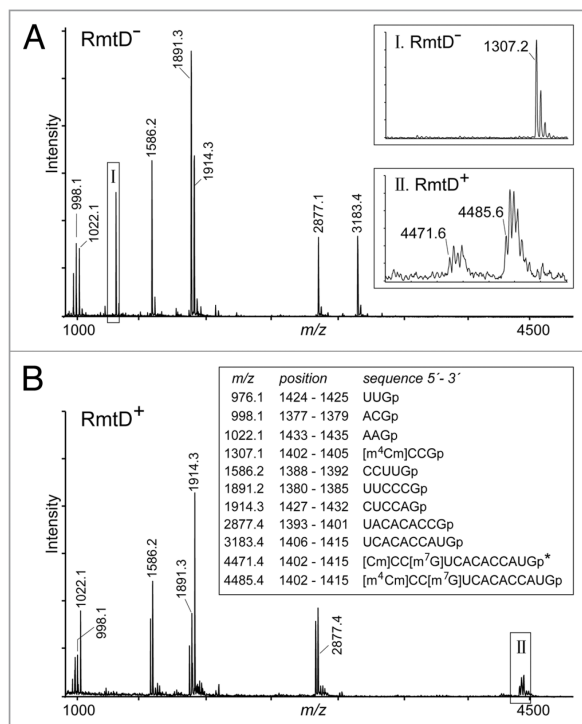
**Acquisition of the RmtD methyltransferase confers high-level resistance to aminoglycosides.** The minimal inhibitory concentrations (MICs) of aminoglycoside drugs required to stop growth of *P. aeruginosa* BB1285 are considerably higher than for the susceptible strain PAO1 (Table 2). Expression of *rmtD* in BB1285 facilitates growth of this pathogenic strain at a tobramycin concentration that is over 200-fold higher than required to inhibit cells lacking this methyltransferase gene.



**Figure 3.** Gel autoradiograms of primer extension on *P. aeruginosa* rRNAs. (A) 16S rRNA showing the strong stop directly before the m<sup>3</sup>U1498 modification, and (B) on 23S rRNA with the stop before m<sup>3</sup>Ψ1915. Lanes 1 and 2 are from *P. aeruginosa* strains BB1285 and PAO1, respectively. Read-through at the modification sites was terminated by ddGTP or ddTTP (dideoxy stop) and the intensities of these bands reflect the amounts of unmethylated U1498 and Ψ1915. The dideoxy sequencing reactions C, U, A, and G were performed on PAO1 rRNA.

The *P. aeruginosa* BB1285 rRNAs were analyzed to define the methylation site of RmtD, and to see whether acquisition of this resistance determinant influenced the functioning of any of the housekeeping methyltransferases at adjacent sites. MALDI-MS analysis of 16S rRNA from the BB1285 strain revealed the loss of the two fragments [m<sup>4</sup>Cm]CCG and UCACACCAUG, seen for the susceptible strain at *m/z* 1307 and *m/z* 3183, respectively, with the concomitant appearance of a new fragment [m<sup>4</sup>Cm]CC[m<sup>7</sup>G]UCACACCAUG (C1402-G1415) at *m/z* 4485 (Fig. 4B). This fragment arises because hydrolysis by RNase T1 at G1405 is prevented by the *N*<sup>7</sup>-methylation. The sequence and base position of this methylation were confirmed by primer extension (Fig. S2). The catalysis of m<sup>7</sup>G1405 modification by RmtD and the subsequent high-level resistance to the subset of 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamines aminoglycosides (Table 2) fit well with the function of other Arm/Rmt methyltransferase orthologs characterized to date.<sup>47</sup>

**Interference between acquired and indigenous methyltransferases.** Closer scrutiny of the spectral region around *m/z* 4485 in the BB1285 strain reveals a second peak at *m/z* 4471, corresponding to a proportion of 16S rRNA molecules with two (rather than three) methyl groups in the C1402-G1415 sequence. Obviously the m<sup>7</sup>G1405 methylation is still present, otherwise the sequence would have been cleaved to lower masses and, therefore, the methyl group at the 2'-*O*- or the *N*<sup>7</sup>-position of C1402 must be missing. In the PAO1 strain where there is no m<sup>7</sup>G1405 methylation, nucleotide C1402 is present in the fragment at *m/z* 1307, and the lack of any smaller peaks in this spectral region (Fig. 4A)



**Figure 4.** MALDI-MS spectra of RNase T1 fragments from the 16S rRNA sequence C1378-G1432 derived from aminoglycoside-susceptible and -resistant *P. aeruginosa* strains. (A) In the RmtD strain PAO1, G1405 is unmodified and migrates in the *m/z* 1307 fragment; nucleotide C1407 is in the RNase T1 fragment at *m/z* 3183 and contains no modification. (B) In the resistant RmtD<sup>+</sup> strain BB1285, these two fragments are completely absent, and a new peak appears at *m/z* 4485, indicating stoichiometric methylation at m<sup>7</sup>G1405. The minor peak at *m/z* 4471 (box II) arises from partial loss of one of the C1402 methylations, both of which were stoichiometric prior to RmtD expression (box I). There was insufficient fragment material to determine whether RmtD interferes with the 2'-O- or N<sup>6</sup>-methylation at C1402 (\*). The multiple tops in the enlargement (boxes) reflect the natural distribution of <sup>12</sup>C and <sup>13</sup>C isotopes; the <sup>12</sup>C monoisotopic masses of products with linear 3'-phosphates are given here; in spectrum B, smaller amounts of 2'-3'-cyclic products are evident to the left of each main peak.

shows that both the 2'-O- and N<sup>6</sup>-methylations are added stoichiometrically. Incomplete methylation at C1402 in the BB1285 strain indicates that RmtD is impeding one of the C1402 methylation reactions.

Other recent studies have shown a reduction in modification by the *E. coli* enzyme RsmF at 16S rRNA m<sup>3</sup>C1407 in the presence of Sgm<sup>48</sup> or Arm/Rmt methyltransferases,<sup>49</sup> all of which methylate the 7-position of G1405. Despite this interference with the function of a housekeeping methyltransferase, expression of the chromosome-coded *arm/rmt* genes did not entail any detectable fitness cost, measured in terms of growth rate and competition under laboratory conditions.<sup>49</sup> The RsmI and RsmH enzymes responsible for the 2'-O- and N<sup>6</sup>-methylations of C1402 are present in all bacterial species and are thus more

highly conserved than RsmF. Interference with modification at C1402 might therefore be expected to have a more distinct (but as yet undefined) biological cost.

Common for all these housekeeping enzymes that methylate the decoding region (Table 1), as well as for those associated with resistance such as Arm/Rmt<sup>47</sup> and TlyA,<sup>50</sup> is that they all require a 16S rRNA substrate that has been assembled with its r-proteins. The reactions performed by these methyltransferases coincide within a time-frame subsequent to 30S subunit assembly, but prior to its association with the 50S. Considering the sizes of the methyltransferases and the spatial proximity of their targets, it is perhaps not surprising that steric hindrance occurs when an extra enzyme such as RmtD is introduced. The fact that modifications by the indigenous rRNA methyltransferase are for the most part stoichiometric reflects how these enzymes have evolved in conjunction with the ribosomal components such that they function effectively in a highly orchestrated manner.

## Materials and Methods

**Bacterial strains and isolation of rRNA.** The strains used in this study were the wild-type *P. aeruginosa* PAO1 and *P. aeruginosa* strain BB1285, an aminoglycoside-resistant clinical isolate from Brazil harbouring *rmtD* and *bla* (SPM-1). The strains were cultured at 37 °C in 200 ml Luria-Bertani broth (Difco) containing kanamycin at 50 µg/ml where appropriate. Cells were grown to mid-log phase, harvested by centrifugation, washed twice with 50 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl at 4 °C, and then lysed by sonication in the same buffer. Cell debris was removed by centrifugation, the supernatant was extracted with phenol and chloroform to remove proteins, and the total cellular RNA was recovered by ethanol precipitation.

**Bioinformatic analyses.** BLAST searches<sup>51</sup> were restricted to the *P. aeruginosa* PAO1 genome<sup>52</sup> using the sequences of modification enzymes from *E. coli* strain K-12 sub-strain W3110 (GenBank accession number NC\_007779) as queries. These *E. coli* enzymes were previously characterized as being responsible for methylation and uridine isomerization adjacent to the aminoglycoside binding sites, and include RsmA, RsmE, RsmF, RsmH, RsmI, and RsmJ modifying *E. coli* 16S rRNA, and RlmD, RlmH, RlmI, and RluD that are specific for 23S rRNA (Table 1).

**MALDI mass spectrometry analysis.** Specific sequences of approximately 50 nucleotides were isolated from the 16S and 23S rRNAs of *P. aeruginosa* strains PAO1 and BB1285. Five complementary deoxyoligonucleotides were hybridized to the *P. aeruginosa* 16S rRNA sequences C1378 to G1432, C1460 to C1510, and G1487 to A1542 and the 23S rRNA sequence C1924 to G1978 and A1889 to G1948 (strain PAO1 GenBank accession number AE004091); the *E. coli* numbering system is used throughout (Fig. 1). 100 pmol of rRNA was heated with 500 pmol of deoxyoligonucleotide at 80 °C for 5 min and cooled to 35 °C over 2 h. Regions of the rRNAs that were not protected by hybridization were removed by digestion with 20 U of mung bean nuclease (NE Biolabs) and 0.25 µg of RNase A (Sigma-Aldrich), and the protected rRNA sequences were separated by



gel electrophoresis.<sup>43,53</sup> Each isolated rRNA sequence was digested overnight with 3 U of RNase T1 (Roche Diagnostics) or 0.25 µg of RNase A (Sigma-Aldrich) at 37 °C in 3 µl aqueous solution of 60 mM 3-hydroxypicolinic acid. Samples were analyzed by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization mass spectrometry (MALDI-MS, Voyager Elite, Perseptive Biosystems) recording in reflector and positive ion mode.<sup>54</sup> Spectra were interpreted with the program *m/z* (Proteometrics Inc.).

**Primer extension analysis.** Several rRNA modifications, including m<sup>3</sup>U and m<sup>3</sup>Ψ, can be detected by their ability to impede reverse transcription. Primers complementary to 16S rRNA nucleotides 1501–1517 and 23S rRNA nucleotides 1920–1939 were used to evaluate the modifications at m<sup>3</sup>U1498 and m<sup>3</sup>Ψ1915, respectively. Extensions were performed with 1 mM dTTP, dATP, dCTP, and 5 mM ddGTP; the reactions stop immediately before m<sup>3</sup>U or m<sup>3</sup>Ψ, or run through on unmethylated rRNA templates to be terminated by ddG at the next cytosine in the sequence. Primer 1459–1479 was used for detection of methylation at the N<sup>7</sup>-position of G1405 (m<sup>7</sup>G1405) after reduction of the rRNAs with sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>), followed by cleavage with aniline.<sup>55</sup> The cleavage reaction is generally incomplete<sup>56</sup> and was improved by including hypermethylated tRNA carrier in the reactions.<sup>57</sup> Each deoxynucleotide primer was 5'-end labeled with <sup>32</sup>P, and 3 pmol was extended on 2 µg of rRNA with 1.5 U of AMV reverse transcriptase (Finnzymes).<sup>58</sup> Extensions products were run on denaturing polyacrylamide/urea gels alongside dideoxy sequencing reactions performed on *P. aeruginosa* PAO1 rRNAs. Gel bands were visualized and quantified by phosphorimaging (Typhoon, Amersham Biosciences), and the stoichiometry of m<sup>3</sup>U and m<sup>3</sup>Ψ modifications was calculated from the ratio of the methylated:dideoxy bands.

**Antimicrobial susceptibility testing.** *P. aeruginosa* strains were studied using in-house microtiter plates according to the CLSI guidelines<sup>59</sup> to evaluate their susceptibility to the 4,6-disubstituted 2-DOS aminoglycosides, gentamicin, kanamycin, tobramycin, amikacin, and arbekacin, and also to the 4,5-disubstituted 2-DOS, neomycin, and the 4-substituted 2-DOS, apramycin (Table 2).

**Table 2.** Susceptibilities to aminoglycosides of the *P. aeruginosa* strains PAO1 and BB1285 *rmtD*<sup>+</sup>

	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> BB1285 ( <i>rmtD</i> <sup>+</sup> )
Aminoglycoside	MIC (µg/mL)	
Gentamicin	2	> 512
Kanamycin	128	> 512
Tobramycin	0.5	128
Amikacin	2	> 512
Arbekacin	4	> 512
Neomycin	8	32
Apramycin	8	8

The relatively high tolerance of the PAO1 strain to kanamycin is due to a mechanism unrelated to rRNA modification. Here, a chromosomally encoded N<sup>5</sup>-acetyltransferase<sup>60</sup> confers resistance to a subset of aminoglycosides.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### Acknowledgments

Natalia Montero, Simon Rose, and Lykke Haastrup Hansen are thanked for excellent technical assistance. We acknowledge the Universidad Complutense de Madrid for the PhD scholarship of BG. This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO 2010-20204 and PRI-PIBIN-2011-0915), the EU FP7 Health Project EvoTAR, and Marie-Curie Action ITN Train-Asap FP7/2007-2013 (n°289285). SD gratefully acknowledges support from the Danish Research Agency (FNU-rammebevillinger 09-064292/10-084554).

#### Supplemental Material

Supplemental material may be found here:  
<http://www.landesbioscience.com/journals/rnabiology/article/25984/>

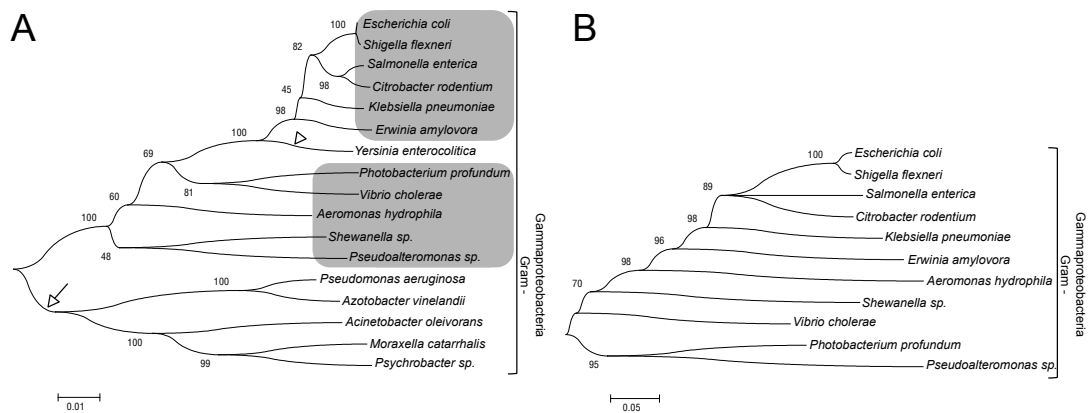
#### References

- Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 1996; 271:64-7; PMID:8539601; <http://dx.doi.org/10.1126/science.271.5245.64>
- Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, Molin S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10:841-51; PMID:23147702; <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2907>
- Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:8487-92; PMID:16687478; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602138103>
- Geller DE, Pitlick WH, Nardella PA, Tracewell WG, Ramsey BW. Pharmacokinetics and bioavailability of aerosolized tobramycin in cystic fibrosis. *Chest* 2002; 122:219-26; PMID:12114362; <http://dx.doi.org/10.1378/chest.122.1.219>
- Gibson RL, Emerson J, McNamara S, Burns JL, Rosenfeld M, Yunker A, Hamblett N, Accurso F, Dovey M, Hiatt P, et al. Cystic Fibrosis Therapeutics Development Network Study Group. Significant microbiological effect of inhaled tobramycin in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:841-9; PMID:12480612; <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200208-855OC>
- Ogle JM, Ramakrishnan V. Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:129-77; PMID:15952884; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.061903.155440>
- Davies J, Davis BD. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *J Biol Chem* 1968; 243:3312-6; PMID:5656371
- Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 2000; 407:340-8; PMID:11014183; <http://dx.doi.org/10.1038/35030019>
- Fourmy D, Recht MI, Blanchard SC, Puglisi JD. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* 1996; 274:1367-71; PMID:8910275; <http://dx.doi.org/10.1126/science.274.5291.1367>
- Moazed D, Noller HF. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 1987; 327:389-94; PMID:2953976; <http://dx.doi.org/10.1038/327389a0>
- Purohit P, Stern S. Interactions of a small RNA with antibiotic and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature* 1994; 370:659-62; PMID:8065453; <http://dx.doi.org/10.1038/370659a0>
- Vicens Q, Westhof E. Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding site. *Chem Biol* 2002; 9:747-55; PMID:12079787; [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00153-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00153-9)
- Shandrick S, Zhao Q, Han Q, Ayida BK, Takahashi M, Winters GC, Simonsen KB, Vourloumis D, Hermann T. Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43:3177-82; PMID:15199571; <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200454217>

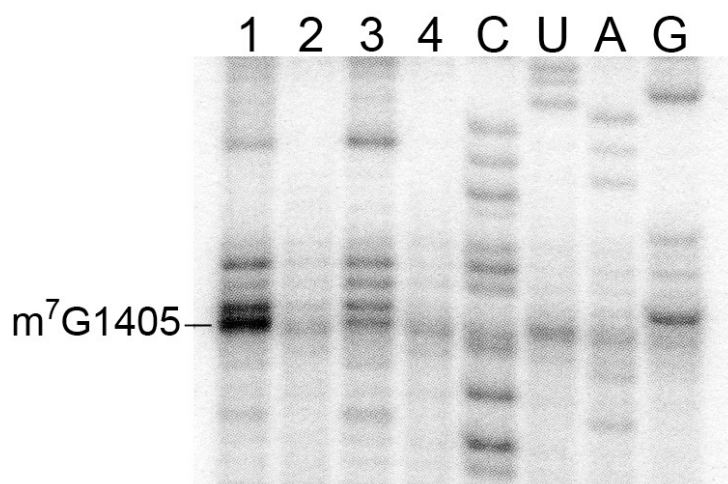
14. Borovinskaya MA, Pai RD, Zhang W, Schuwirth BS, Holton JM, Hirokawa G, Kaji H, Kaji A, Cate JH. Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14:727-32; PMID:17660832; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1271>
15. Wang L, Pulk A, Wasserman MR, Feldman MB, Altman RB, Cate JHD, Blanchard SC. Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19:957-63; PMID:22902368; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2360>
16. Cate JH, Yusupov MM, Yusupova GZ, Earnest TN, Noller HF. X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* 1999; 285:2095-104; PMID:10497122; <http://dx.doi.org/10.1126/science.285.5436.2095>
17. O'Connor M, Gregory ST. Inactivation of the RluD pseudouridine synthase has minimal effects on growth and ribosome function in wild-type *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 2011; 193:154-62; PMID:21037010; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00970-10>
18. Scheunemann AE, Graham WD, Vendeix FA, Agris PF. Binding of aminoglycoside antibiotics to helix 69 of 23S rRNA. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:3094-105; PMID:20110260; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp1253>
19. Ofengand J, Del Campo M. Modified nucleosides in *Escherichia coli* ribosomal RNA. In: Curtiss R, ed. *EcoSal-*Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology*. Washington, DC: ASM, 2004; chapter 4.6.1.
20. Decatur WA, Fournier MJ. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* 2002; 27:344-51; PMID:12114023; [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02109-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02109-6)
21. Kimura S, Suzuki T. Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:1341-52; PMID:19965768; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp1073>
22. Andersen NM, Douthwaite S. YebU is a m<sup>6</sup>C methyltransferase specific for 16 S rRNA nucleotide 1407. *J Mol Biol* 2006; 359:777-86; PMID:16678201; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.007>
23. Basturea GN, Rudd KE, Deutscher MP. Identification and characterization of RsmE, the founding member of a new RNA base methyltransferase family. *RNA* 2006; 12:426-34; PMID:16431987; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2283106>
24. Basturea GN, Dague DR, Deutscher MP, Rudd KE. YhiQ is RsmJ, the methyltransferase responsible for methylation of G1516 in 16S rRNA of *E. coli*. *J Mol Biol* 2012; 415:16-21; PMID:22079366; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.10.044>
25. Helsler TL, Davies JE, Dahlberg JE. Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. *Nat New Biol* 1972; 235:6-9; PMID:4336392; <http://dx.doi.org/10.1038/newbio235006a0>
26. Poldermans B, Roza L, Van Knippenberg PH. Studies on the function of two adjacent N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dimethyladenosines near the 3' end of 16 S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. III. Purification and properties of the methylating enzyme and methylase-30 S interactions. *J Biol Chem* 1979; 254:9094-100; PMID:383712
27. Purta E, Kaminska KH, Kasprzak JM, Bujnicki JM, Douthwaite S. YbeA is the m<sup>6</sup>Ψ methyltransferase RlmH that targets nucleotide 1915 in 23S rRNA. *RNA* 2008; 14:2234-44; PMID:18755835; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.1198108>
28. Ero R, Peil L, Liiv A, Remme J. Identification of pseudouridine methyltransferase in *Escherichia coli*. *RNA* 2008; 14:2223-33; PMID:18755836; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.1186608>
29. Agarwalla S, Kealey JT, Santi DV, Stroud RM. Characterization of the 23 S ribosomal RNA m<sup>6</sup>U1939 methyltransferase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2002; 277:8835-40; PMID:11779873; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111825200>
30. Madsen CT, Mengel-Jørgensen J, Kirpekar F, Douthwaite S. Identifying the methyltransferases for m<sup>6</sup>U747 and m<sup>6</sup>U1939 in 23S rRNA using MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:4738-46; PMID:12907714; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg657>
31. Purta E, O'Connor M, Bujnicki JM, Douthwaite S. YccW is the m<sup>6</sup>C methyltransferase specific for 23S rRNA nucleotide 1962. *J Mol Biol* 2008; 383:641-51; PMID:18786544; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.061>
32. Machnicka MA, Milanowska K, Osman Oglou O, Purta E, Kurkowska M, Olchowik A, Januszewski W, Kalinowski S, Dunin-Horkawicz S, Rother KM, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue):D262-7; PMID:23118484; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1007>
33. Galimand M, Schmitt E, Panvert M, Desmolaize B, Douthwaite S, Mechulam Y, Courvalin P. Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m<sup>6</sup>C1404-specific methyltransferase EfmM. *RNA* 2011; 17:251-62; PMID:21159796; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2233511>
34. Conn GL, Savic M, Macmaster R. DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, mechanism, function and evolution. In: Grosjean H, ed. *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, mechanism, function and evolution*. Austin, Texas: Landes BioScience., 2009; pp. 525-36.
35. Cundliffe E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* 1989; 43:207-33; PMID:2679354; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.43.100189.001231>
36. Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Update* 2012 Elsevier Ltd, 2012; 15:133-48.
37. Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, Prasad KN, Woodford N, Gonzalez-Zorn B. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:1543-50; PMID:23580560; <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt078>
38. Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:2397-400; PMID:23459483; <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02108-12>
39. O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, Doi Y. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:2413-6; PMID:23478957; <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00266-13>
40. Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m<sup>6</sup>A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:4401-9; PMID:17875999; <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00926-07>
41. Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3388-90; PMID:17576840; <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00443-07>
42. O'Farrell HC, Pulicherla N, Desai PM, Rife JP. Recognition of a complex substrate by the KsgA/Dim1 family of enzymes has been conserved throughout evolution. *RNA* 2006; 12:725-33; PMID:16540698; <http://dx.doi.org/10.1261/ma.2310406>
43. Douthwaite S, Kirpekar F. Identifying modifications in RNA by MALDI mass spectrometry. *Methods Enzymol* 2007; 425:3-20; PMID:17673077; [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)25001-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(07)25001-3)
44. Zhang H, Wan H, Gao ZQ, Wei Y, Wang WJ, Liu GF, Shrykova EV, Xu JH, Dong YH. Insights into the catalytic mechanism of 16S rRNA methyltransferase RsmE (mæU1498) from crystal and solution structures. *J Mol Biol* 2012; 423:576-89; PMID:22925577; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.016>
45. Johansen SK, Maus CE, Plikaytis BB, Douthwaite S. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *thyA*-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Mol Cell* 2006; 23:173-82; PMID:16857584; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.044>
46. Raychaudhuri S, Conrad J, Hall BG, Ofengand J. A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of *Escherichia coli*. *RNA* 1998; 4:1407-17; PMID:9814761; <http://dx.doi.org/10.1017/S1355838298981146>
47. Liou GF, Yoshizawa S, Courvalin P, Galimand M. Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *J Mol Biol* 2006; 359:358-64; PMID:16626740; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.038>
48. Cubrilo S, Babi F, Douthwaite S, Maravi Vlahovick G. The aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm impedes RsmF methylation at an adjacent rRNA nucleotide in the ribosomal A site. *RNA* 2009; 15:1492-7; PMID:19509304; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.1618809>
49. Gutierrez B, Escudero JA, San Millan A, Hidalgo L, Carrilero L, Ovejero CM, Santos-Lopez A, Thomas-Lopez D, Gonzalez-Zorn B. Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:2335-41; PMID:22330907; <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06066-11>
50. Monshupanee T, Johansen SK, Dahlberg AE, Douthwaite S. Capreomycin susceptibility is increased by TlyA-directed 2'-O-methylation on both ribosomal subunits. *Mol Microbiol* 2012; 85:1194-203; PMID:22779429; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08168.x>
51. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-402; PMID:9254694; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
52. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406:959-64; PMID:10984043; <http://dx.doi.org/10.1038/35023079>
53. Andersen TE, Porse BT, Kirpekar F. A novel partial modification at C2501 in *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *RNA* 2004; 10:907-13; PMID:15146074; <http://dx.doi.org/10.1261/ma.5259404>
54. Kirpekar F, Douthwaite S, Roepstorff P. Mapping posttranscriptional modifications in 5S ribosomal RNA by MALDI mass spectrometry. *RNA* 2000; 6:296-306; PMID:10688367; <http://dx.doi.org/10.1017/S1355838200992148>
55. Peattie DA. Direct chemical method for sequencing RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:1760-4; PMID:377283; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.4.1760>

- 
56. Douthwaite S, Garrett RA, Wagner R. Comparison of *Escherichia coli* tRNA<sup>Pro</sup> in the free state, in the ternary complex and in the ribosomal A and P sites by chemical probing. *Eur J Biochem* 1983; 131:261-9; PMID:6187569; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07258.x>
57. Zueva VS, Mankin AS, Bogdanov AA, Baratova LA. Specific fragmentation of tRNA and rRNA at a 7-methylguanine residue in the presence of methylated carrier RNA. *Eur J Biochem* 1985; 146:679-87; PMID:2578958; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08704.x>
58. Stern S, Moazed D, Noller HF. Structural analysis of RNA using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension. *Methods Enzymol* 1988; 164:481-9; PMID:2468070; [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(88\)64064-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(88)64064-X)
59. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th ed. CLSI: PA Wayne, 2009.

## Supplementary figures



**Figure S1. Comparative dendrograms based on bacterial rRNA and *rsmF* sequences.** (A) Dendrogram based on the 16S rRNA gene sequences from different species. Species carrying an *rsmF* ortholog are shaded in grey. Deletion events are indicated with white symbols. The *rsmF* gene could have been acquired initially by an ancestor common to the bacteria that now have *rsmF*, or alternatively from an ancestor common to a wider range of Gammaproteobacteria followed by loss of *rsmF* in a single deletion event within the Pseudomonadales family (white arrow). The latter scenario is supported by *Yersinia*, the only enterobacterium genus lacking RsmF, which was presumably lost at the point indicated (white arrowhead). (B) Dendrogram based on *rsmF* ortholog sequences. Clustal Omega was used for multiple sequence alignments. Dendrograms were constructed using MEGA software, version 5.05, using the Neighbour-Joining grouping procedure with 10,000 bootstrap replicates. Values at the nodes indicate statistical support for the particular branches, according to the bootstrap test.



**Figure S2. Catalysis of the 16S rRNA m<sup>7</sup>G1405 modification by the methyltransferase RmtD.** Gel autoradiogram of primer extension through the G1405 region of 16S rRNA. The rRNAs were isolated from *P. aeruginosa* RmtD (lanes 1 and 2) or from *P. aeruginosa* PAO1 (lanes 3 and 4) and were either treated with NaBH<sub>4</sub>/aniline (lanes 1 and 3) or left untreated (lanes 2 and 4). In lane 1, rRNA scission stops reverse transcriptase immediately prior to the site of RmtD methylation at G1405. The scission reaction is incomplete, thus the band intensity does not reflect the level of methylation at this nucleotide (see Materials and Methods). Dideoxy sequencing reactions (C, U, A and G) were carried out on PAO1 rRNA.



### ***III. Novel genetic environment of qnrB2 associated with TEM-1 and SHV-12 on pB1004, an IncHI2 plasmid, in Salmonella Bredeney BB1047 from Spain.***

Hemos caracterizado las bases genéticas del perfil de resistencia de una cepa clínica de *Salmonella* Bredeney que ha resultado ser portadora de un plásmido conjugativo de 315 kb perteneciente al grupo de incompatibilidad IncHI2. Este plásmido contiene múltiples genes de resistencia a antibióticos tales como: el gen que codifica para la enzima modificadora de aminoglucósidos AAC-6-Ib, los genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 y SHV-12 y el gen *qnrB2*, responsable de la resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos y asociado en este caso a un entorno genético nuevo. Dicho entorno posee dos genes homólogos localizados en el cromosoma de la bacteria marina *Marinobacter aquaeolei* VT8, lo cual nos ha sugerido un posible origen marino de este mecanismo de resistencia emergente. Dicho plásmido porta también un integrón de clase I además de elementos de inserción como IS21-like, IS26 e ISCR1, que facilitan el dinamismo de dichos genes de resistencia y su entorno. A su vez, este plásmido está relacionado genéticamente con los plásmidos pEC-IMP y pEC-IMPQ, de 318 y 324 kb respectivamente, descritos en Taiwan en aislados clínicos de *Enterobacter cloacae*. Las diferencias entre estos tres plásmidos se van a deber principalmente a la transposición de genes mediante círculo rodante mediada por ISCR1. Cabe destacar que, posteriormente, se han identificado genes *qnr* coexistiendo con las metilasas adquiridas del ARNr 16S en una misma bacteria.





**Novel genetic environment of *qnrB2* associated with TEM-1 and SHV-12 on pB1004, an IncHI2 plasmid, in *Salmonella* Bredeney BB1047 from Spain**Belén Gutierrez<sup>1,2</sup>, Silvia Herrera-Leon<sup>3</sup>,  
José Antonio Escudero<sup>1,2</sup>, Laura Hidalgo<sup>1,2</sup>,  
Rubén Gonzalez-Sanz<sup>3</sup>, Margarita Arroyo<sup>3</sup>,  
Álvaro San Millán<sup>1,2</sup>, María Aurora Echeita<sup>3</sup>  
and Bruno Gonzalez-Zorn<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain; <sup>2</sup>Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain; <sup>3</sup>Laboratorio de Referencia de *Salmonella*, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Keywords: ESBLs, fluoroquinolones, pEC-IMPQ

\*Corresponding author. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Tel: +34-91-394-37-07; Fax: +34-91-394-39-08; E-mail: bgzorn@vet.ucm.es

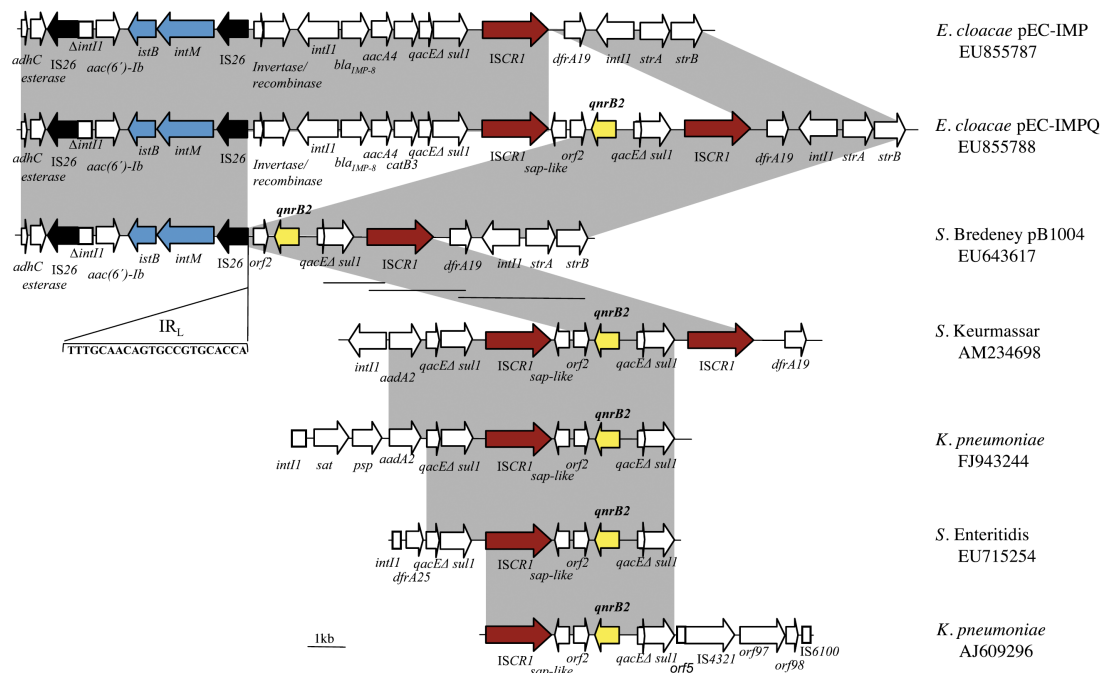
Sir,

Resistance to fluoroquinolones through plasmid-mediated *qnr* genes, especially when associated with resistance to cephalosporins by extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), is an emerging phenomenon in enterobacteria. This is worrisome in the case of *Salmonella*, as these are two of the major antimicrobials used in invasive salmonellosis.<sup>1</sup> We report here the presence of a *qnrB2* gene in a *Salmonella* Bredeney clinical isolate, BB1047, from Spain. The gene was borne by a self-transferable IncHI2 plasmid, pB1004, associated with *bla*<sub>TEM-1</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub>. The genetic environment of *qnrB2* revealed a common evolutionary origin with plasmid pEC-IMPQ recently described in *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Taiwan. In 2005, a 76-year-old woman in an intensive care unit in South Spain suffered from insidious wound infection. Microbial analysis showed that *Salmonella* Bredeney, BB1047, was the causative agent. Complete antimicrobial profile revealed that the bacterium possessed an unusual multidrug resistance profile [Table S1, available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>)]. In order to characterize the genetic basis of the resistance profile, conjugation experiments were performed. Resistance to  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, chloramphenicol, tetracycline and fluoroquinolones could be transferred *en bloc* into *Escherichia coli* K802N (*res*<sup>-</sup>, *gyrA*, *Nal*<sup>R</sup>) at a frequency of  $1 \times 10^{-5}$  per donor cfu, giving rise to transconjugant BB1048 (Table S1). Using the S1-PFGE method, the size of the plasmid in BB1047 and BB1048 was estimated to be ~315 kbp, and was named pB1004 (data not shown). Hybridization with  $\beta$ -lactamase probes (OXA, CMY, CTX, TEM and SHV) and sequencing revealed that the genes

encoding TEM-1 and SHV-12 were located in pB1004. In order to characterize pB1004, the plasmid was extracted, digested with HindIII, ligated into pUC19, transformed into *E. coli* and plated on brain heart infusion agar plates containing ampicillin (50 mg/L). Two different clones were obtained, bearing a 7613 bp and a 4489 bp fragment that were completely sequenced in both strands by genome walking (GenBank accession numbers EU643617 and FJ973574). The 4489 bp fragment encoded the *trhA* and *trhL* genes, as well as most of the putative replication origin of the plasmid. It was 100% identical to the IncHI2 plasmids pK29 from *Klebsiella pneumoniae* (GenBank accession number EF382672), R478 from *Serratia marcescens* (GenBank accession number BX664015) and the recently described plasmids pEC-IMP and pCE-IMPQ in *E. cloacae* from Taiwan.<sup>2</sup> When compared with the rest of the sequences present in the databases, the fragment differed by 26 nucleotides from other IncHI2 plasmids, like plasmid pAPEC-O1-R from *E. coli* (GenBank accession number DQ517526). Thus, pB1004 can be assigned to the R478 subfamily of the IncHI2 plasmids described to date.

Sequence analysis of the 7613 bp revealed the presence of the *qnrB2* gene, the structural gene of the QnrB2 protein.<sup>3</sup> To assess whether *qnrB2* was responsible for quinolone resistance in this strain (Table S1), the gene was amplified together with the putative promoter and terminator regions with primers *qnrB2F* (5'-CGACCGGGAAAATTGACATG-3') and *qnrB2R* (5'-CAGGGATGGATTTCAGAACC-3'), and cloned into pCR2.1. The resulting transformant, BB1049, showed reduced susceptibility to quinolones and fluoroquinolones (Table S1) demonstrating that *qnrB2* contributes to the phenotype of BB1047 against these antimicrobials.

The *qnrB2* gene was described for the first time in *Citrobacter koseri* (GenBank accession number DQ351242), and was detected thereafter in *Proteus mirabilis* (GenBank accession number EF488762), *E. cloacae* (GenBank accession number EU131184), *Citrobacter freundii* (GenBank accession numbers AB281054 and FJ232918), *K. pneumoniae* (GenBank accession numbers AJ609296 and FJ943244) and *Salmonella enterica* serovars Enteritidis,<sup>4</sup> Keurmassar<sup>5</sup> and Mbandaka. The genetic environment of *qnrB2* has been described in the *Salmonella* Enteritidis and Keurmassar serovars, as well as in the *Klebsiella* strains and partially in *C. koseri*, being highly similar in all bacteria described to date (Figure 1). In pB1004, immediately upstream of *qnrB2*, an IS26 is followed by two genes homologous to genes located in the chromosome of the marine bacterium *Marinobacter aquaeolei* VT8 (GenBank accession number CP000514). The *intM* gene encodes IntM, a 513 amino acid protein with 68.3% identity with Maqu\_0026, encoding the catalytic domain of the IS21 transposase. Downstream of *intM*, *istB* codes for IstB, an ATP-binding protein with 83.4% identity with Maqu\_0025 of *M. aquaeolei* involved in the transposition of IS21-like elements. The two genes are located in the same order in the chromosome of *M. aquaeolei* VT8. Interestingly, both genes are present in the recently described Taiwanese IncHI2 plasmids pEC-IMP and pEC-IMPQ, the latter also bearing the *qnrB2* gene. Further



**Figure 1.** Schematic representation of the genetic environments of the *qnrB2* gene described to date. Grey shading denotes  $\geq 99\%$  nucleotide identity. Black lines beneath *Salmonella* Bredeney indicate the regions that have been amplified by overlapping PCR and sequenced using the nucleotide sequence of pEC-IMPQ for the design of appropriate primers. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

analysis by PCR and sequencing of the genetic environment of *qnrB2* revealed the existence of an 8939 bp deletion including an *ISCR1* element and a class I integron with the *bla*<sub>IMP-8</sub> metallo-β-lactamase gene.

Here we report the identification of a *qnr* gene in *Salmonella* in Spain. Previously, *qnrB2* has been identified in *Enterobacter* spp. and *qnrA* has been detected in *E. coli*, *E. cloacae* and *K. pneumoniae*, whereas the *qnrS* gene has been shown to be present in a *K. pneumoniae* clinical isolate in this country. In other countries like France, the UK, Germany, Israel, Australia, the USA, Taiwan, the Netherlands and Senegal, the *qnrB* gene is largely present.<sup>6</sup> In the latter four, *Salmonella* spp. was the host bacterium of the *qnrB2* gene. In Taiwan, the gene was present in the serovar Enteritidis,<sup>4</sup> and possessed a similar genetic environment to that described previously for *Salmonella* Keurmassar.<sup>5</sup> Interestingly, the single *qnrB2*-bearing *Salmonella* originating from a Dutch broiler chicken also belongs to serovar Bredeney (isolate 137.25)<sup>6</sup> and was suspected to be potentially linked to the Bredeney isolate from Spain. However, the genetic environment flanking the *qnrB2* gene and the plasmid incompatibility groups are completely different for the two Bredeney isolates from the Netherlands and Spain (IncN-p137.25 and IncHI2-pB1004, respectively), suggesting independent events of acquisition of *qnrB2*-carrying plasmids in these isolates.<sup>7</sup>

In contrast, the genetic environment of the *qnrB2*, as well as the partial sequence of the plasmid backbone, reveals a striking common evolutionary origin of pB1004 with pEC-IMPQ. This is further supported by the plasmid size of a Taiwanese plasmid

that has been shown to be 324 kbp,<sup>2</sup> as compared with the 315 kbp from pB1004. It is tempting to speculate that the ISCR1 element has been responsible for the deletion of the 8939 bp in pB1004 through rolling-circle replication. However, detailed analysis of the junctions reveals that the deletion occurred upstream of the replication origin of the ISCR1 element. Further, a perfect IR<sub>L</sub> ('left inverted repeat') structure in the IS26 element downstream of *qnrB2* is evident in pB1004, indicating that insertion of IS26 occurred after deletion of the 8939 bp fragment. These results confirm emergence in Spain of pB1004, an IncHI2 plasmid related to pEC-IMPQ, that associates the *qnrB2* gene with SHV-12 and TEM-1.

## Acknowledgements

N. Montero is acknowledged for excellent technical assistance.

## Funding

This work was supported by WP29 of the Network of Excellence FOOD-CT-506122 MED-VET-NET and the MICINN (GEN2006-27767-E/PAT). J. A. E., A. S. M. and L. H. acknowledge the Universidad Complutense de Madrid, the Spanish Ministry of Education and Science and the Comunidad de Madrid for their respective fellowships.

## Research letter

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

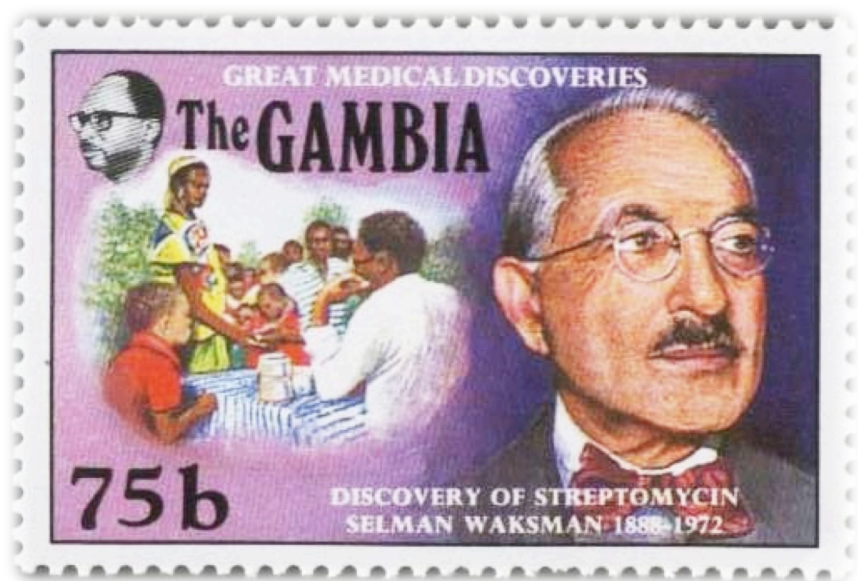
Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

1. Hopkins KL, Day M, Threlfall EJ. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica*, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 340–2.
2. Chen YT, Liao TL, Liu YM *et al*. Mobilization of *qnrB2* and *ISCR1* in plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1235–7.
3. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM *et al*. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1178–82.
4. Wu JJ, Ko WC, Chiou CS *et al*. Emergence of Qnr determinants in human *Salmonella* isolates in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 1269–72.
5. Garnier F, Raked N, Gassama A *et al*. Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3200–2.
6. Veldman K, van Pelt W, Mevius D. First report of *qnr* genes in *Salmonella* in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 452–3.
7. Fortini D, García-Fernández A, Veldman K *et al*. Novel genetic environment of plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrB2* in *Salmonella* Bredeney from poultry. *J Antimicrob Chemother* 2009; in press.

*Supplementary table***Table S1. MICs of various antibiotics for *Samonella* Bredeney and *E. coli* with and without *qnrB2*.**

	MIC (mg/ L)				
	BB1047	BB1048	K802N	BB1049	INVF'(pCR2.1)
Gatifloxacin	0.75	1.5	0.125	0.064	0.002
Levofloxacin	0.75	1	0.25	0.064	0.004
Ofloxacin	0.75	4	0.75	0.38	0.016
Norfloxacin	0.5	2	1	0.38	0.016
Moxifloxacin	0.5	0.75	0.25	0.25	0.002
Enrofloxacin	2	3	0.75	0.25	0.002
Ciprofloxacin	0.25	0.25	0.125	0.125	0.002
Nalidixic Acid	12	>256	>256	4	0.5
Amoxicillin	>256	>256	6	>256	> 256
Amox./Clavunate	3	6	4	8	8
Cefotaxime	8	3	0.125	0.064	0.064
Chloramphenicol	>256	>256	6	1	1
Amikacin	8	6	0.75	1.5	1.5
Gentamicin	96	64	0.125	0.25	0.25
Tobramycin	32	12	0.25	0.25	0.25
Tetracycline	128	128	1.5	1	1



Discusión

Imagen: Sello en honor a Selman Waksman por el descubrimiento de la estreptomicina, expedido en Gambia en 1989. Actualmente en el catálogo *Scott Postage Stamp* No. 910.

## DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se ha estudiado en profundidad el mecanismo de acción, coste biológico e interferencias con las metilaciones intrínsecas de las metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S, un mecanismo de resistencia a aminoglucósidos emergente en los últimos años en bacterias patógenas principalmente pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y al orden *Pseudomonadales*.

Así mismo, durante la búsqueda de dicho mecanismo en aislados clínicos, se han identificado otros mecanismos de resistencia emergentes como son las proteínas Qnr que confieren resistencia a fluoroquinolonas.

Los resultados obtenidos han dado lugar a las tres publicaciones que componen esta tesis doctoral. Esta sección pretende aunar las discusiones de dichos trabajos mostrando la cohesión existente entre ellos. Para lograr este fin, se ha realizado un repaso general de las discusiones relacionando entre sí los resultados obtenidos. Además, se han desarrollado los hallazgos de mayor interés científico obtenidos, lo que, junto con el análisis de información adicional extraída de otras publicaciones que han surgido paralelamente durante este tiempo, ha aportado una visión más global del tema recalcando así su importancia y planteando perspectivas futuras.

### **1. Caracterización del mecanismo de acción de las metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S que confieren resistencia a aminoglucósidos.**

En primer lugar se ha estudiado el mecanismo de acción de las metilasas del ARNr 16S adquiridas que confieren alto nivel de resistencia a aminoglucósidos. Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, este mecanismo ya se había descrito previamente en actinomicetos ambientales productores de aminoglucósidos como un mecanismo de protección intrínseco de sus ribosomas.

Los genes que codifican para las metiltransferasas adquiridas se encuentran a menudo formando parte de elementos genéticos móviles, como transposones localizados en plásmidos<sup>198</sup> que facilitan la transferencia horizontal entre bacterias, o

bien insertados en el propio cromosoma bacteriano como es el caso de RmtC, RmtD o RmtH.<sup>201,258,264</sup>

En este estudio se ha trabajado en primer lugar con las metilasas más prevalentes hasta la fecha localizadas principalmente en la familia *Enterobacteriaceae*: ArmA, RmtB y RmtC, empleando a *E. coli* como hospedador.

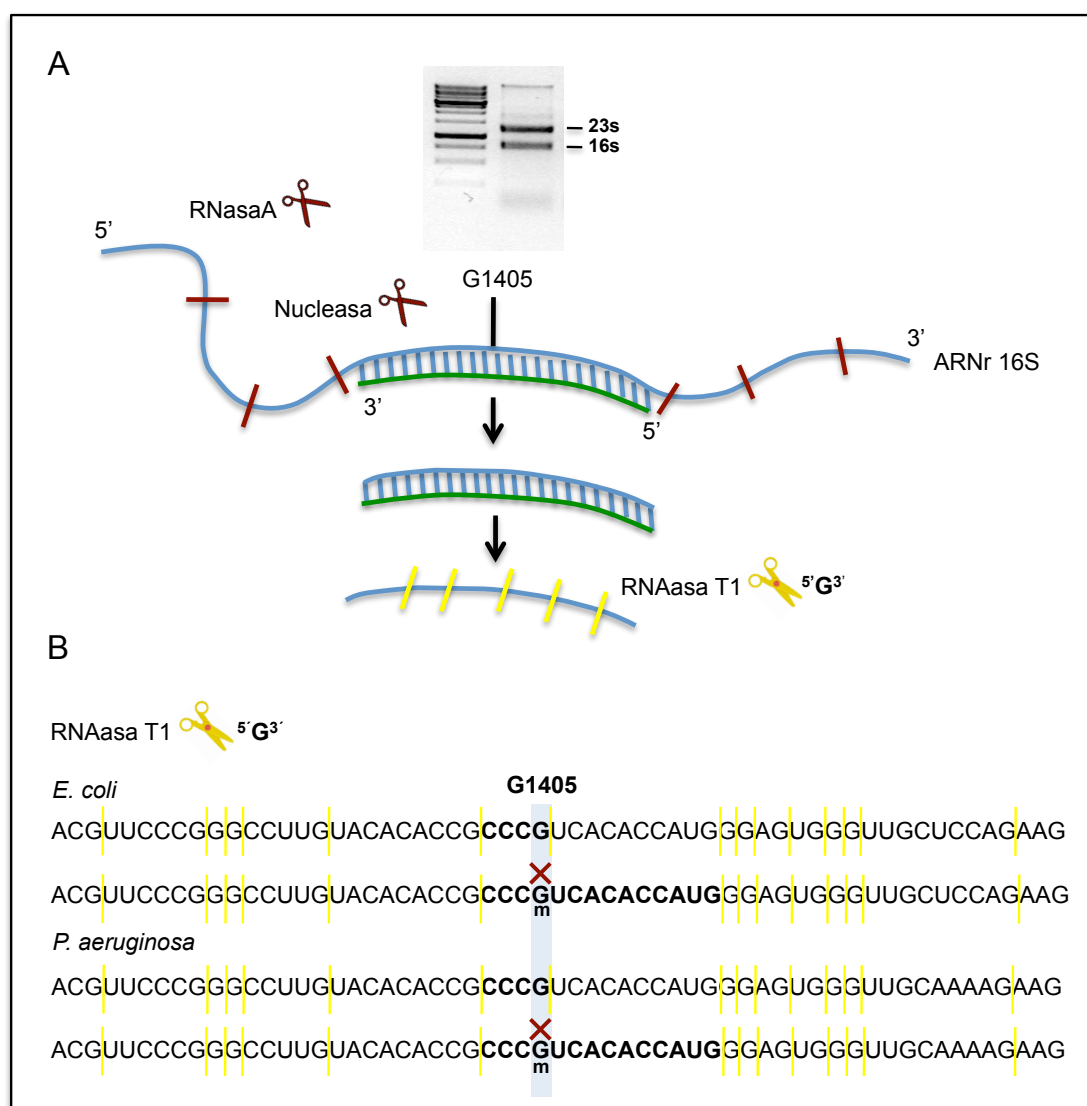
Además de en enterobacterias se ha identificado este tipo de genes de resistencia en el orden *Pseudomonadales*, concretamente en *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*. Debido a la alta prevalencia de aislados de *P. aeruginosa* en Brasil portadores de RmtD<sup>262</sup> y a la gran importancia del uso de aminoglucósidos para el tratamiento de infecciones causadas por este patógeno oportunista, principalmente en pacientes que sufren de fibrosis quística,<sup>169,170</sup> también se ha elegido como modelo de estudio a RmtD en *P. aeruginosa*.

Anteriormente a este trabajo ya se había determinado mediante extensión de cebadores (*primer extension*) el sitio de metilación de las enzimas ArmA, RmtB y RmtC.<sup>241-243</sup> En cuanto a RmtD, nunca antes se había profundizado en el aspecto funcional de la misma sino que su estudio se había limitado únicamente al aspecto descriptivo y epidemiológico.

En este trabajo se ha determinado la posición de metilación de estas cuatro enzimas mediante el estudio de las modificaciones presentes en la región del ARNr diana de los aminoglucósidos, empleando para ello la técnica de espectrometría de masas MALDI. Esta técnica nos aporta información adicional a la proporcionada mediante la extensión de cebadores. De esta manera, además de confirmar la posición y tipo de modificación (grupo metilo), comprobamos si la modificación es total o parcial y estudiamos el resto de modificaciones post-transcripcionales de la región de unión de los aminoglucósidos. A su vez, permite analizar la relación existente entre esta modificación adquirida que confiere resistencia a los mismos y el resto de modificaciones intrínsecas que permiten un correcto funcionamiento del ribosoma. Es por esto que la espectrometría de masas MALDI ha supuesto, mediante este trabajo, un primer paso en el estudio de la interacción de estas enzimas adquiridas con el ribosoma y su integración dentro del patrón de metilación programado que forma parte de la fisiología bacteriana.



En primer lugar se ha medido la concentración mínima inhibitoria (CMI) a diferentes aminoglucósidos necesaria para impedir el crecimiento de las cepas portadoras de metilasas de resistencia adquiridas. Ésta ha resultado ser 200 veces mayor en comparación a la concentración mínima inhibitoria de las cepas carentes de dichas metiltransferasas bajo un mismo entorno genético.



**Figura 25. Fragmentos de ARNr 16S obtenidos para el análisis mediante espectrometría de masas MALDI.** (A) Esquema con los pasos a seguir para la obtención de los fragmentos de ARNr a analizar: extracción del ARNr, hibridación a un oligodeoxinucleótido complementario a la región de estudio, digestión con nucleasa y RNasa-A, purificación del fragmento obtenido y digestión del mismo con RNasa-T1. (B) Patrón de fragmentos obtenidos tras la digestión con RNasa-T1 según la presencia o ausencia del grupo metilo en m<sup>7</sup>G1405 en *E. coli* y *P. aeruginosa*.

En todas las cepas analizadas mediante MALDI MS que poseían una metilasa de resistencia hemos observado la metilación estequiométrica de G1405 en las moléculas del ARNr 16S extraídas. Por el contrario, en las cepas empleadas como control (*E. coli* BW25113 y *P. aeruginosa* PAO1), carentes de estas enzimas, dicha modificación ha resultado estar ausente. Esta afirmación ha sido posible gracias a la capacidad de discriminación que tenemos con dicha técnica en la que la metilación en la posición N7 previene la hidrólisis en G1405 llevada a cabo por la ARNasa-T1. De esta manera en las cepas portadoras de una metilasa de resistencia visualizamos un fragmento de mayor tamaño,  $[m^4Cm]CC[m^7G]U[m^5C]ACACCAUG$  (C1402-G1415) de 4499  $m/z$  en *E. coli* y  $[m^4Cm]CC[m^7G]UCACACCAUG$  (C1402-G1415) de 4485  $m/z$  en *P. aeruginosa*, cuya masa en ambos está incrementada en un grupo metilo en dicha posición. Sin embargo, en las cepas carentes de la metilasa que confiere resistencia a aminoglucósidos, la ARNasa-T1 es capaz de hidrolizar la G1405 y se visualizan dos fragmentos,  $[m^4Cm]CCG$  y  $U[m^5C]ACACCAUG$  de 1307  $m/z$  y 3183  $m/z$  para *E. coli* y  $[m^4Cm]CCG$  y  $UCACACCAUG$  de 1307  $m/z$  y 3183  $m/z$  en *P. aeruginosa*, concluyendo que el grupo metilo en G1405 no está presente (Figura 25). En ninguno de los casos hemos identificado los dos tipos de fragmentos, con y sin metilación en G1405. Esto indica que esta metilación adquirida está presente en el 100% de las moléculas analizadas.

Así mismo se ha llevado a cabo una extensión de cebadores de la región de acción de RmtD, la cual ha permitido corroborar su posición de metilación en  $m^7G1405$ . Esto se ha conseguido gracias a una reducción previa del ARNr con borohidrato de sodio y posterior escisión con anilina, específica para los residuos  $m^7G$ .

Por tanto, con esta primera aproximación se ha determinado que este mecanismo de resistencia resulta muy eficaz dado que la metilación en la posición G1405 del ARNr 16S del ribosoma bacteriano permite resistir a muy altas concentraciones de aminoglucósidos, incluso por encima de 1 mg/ml. Además, se ha podido observar como estas enzimas son muy eficientes en la metilación de los ribosomas ya que no hay evidencias de metilaciones parciales para ninguna de las metilasas testadas. Cabe destacar que al insertar *rmtC* en monocopia junto a su promotor nativo en el cromosoma de *E. coli*, observamos una metilación total de la posición  $m^7G1405$  incluso cuando dicha bacteria crece en un medio libre de antibióticos. La expresión de

este mecanismo de resistencia incluso en ausencia de aminoglucósidos, la gran eficiencia del mismo así como el hecho de que se hayan identificado algunos de estos genes en el cromosoma de bacterias patógenas lleva a pensar que dicha modificación podría llegar a formar parte de las metilaciones intrínsecas de los ribosomas de estas bacterias.

## **2. Modificaciones post-transcripcionales endógenas en el sitio de unión de los aminoglucósidos en el ribosoma de *P. aeruginosa*.**

La estructura del ribosoma de *E. coli* ha sido estudiada en detalle y caracterizada en los últimos años. Por tanto se conocen todas las modificaciones endógenas en su ARNr que aportan al ribosoma su estructura final permitiendo un funcionamiento óptimo del mismo. Estas modificaciones se suelen agrupar en regiones del ribosoma que tienen una función primaria importante. Las dianas primaria y secundaria de los aminoglucósidos están situadas respectivamente en la hélice 44 del ARNr 16S en la cual se lleva a cabo la monitorización de la unión codón-anticodón y en la hélice 69 del ARNr 23S la cual establece uniones con la hélice 44 estabilizando la unión de las dos subunidades ribosomales.<sup>44,141</sup> Se trata de dos regiones clave en el ribosoma y sitio de acción de múltiples metilasas endógenas.

La arquitectura del ribosoma de *P. aeruginosa* no había sido estudiada previamente. Dada la importancia del empleo de aminoglucósidos en el tratamiento de infecciones causadas por este patógeno oportunista sumada a la falta de síntesis de nuevos antibióticos y al incremento en la aparición de nuevas formas de resistencia a los antibióticos en uso, en este trabajo se ha estudiado la estructura de las dos dianas de unión de los aminoglucósidos en *P. aeruginosa*. El genoma de la PAO1 está completamente secuenciado<sup>277</sup> y nos ha permitido identificar las metilasas homólogas a las previamente caracterizadas en *E. coli*. De esta manera, se han mapeado las modificaciones endógenas en dichas zonas tanto de una cepa de *P. aeruginosa* sensible a aminoglucósidos como de una cepa que ha adquirido una metilasa que confiere resistencia a los mismos (Figura 26). Lo más sorprendente son las



Las modificaciones en A1518 y A1519 han resultado ser dimetilaciones estequiométricas que en *E. coli* están llevadas a cabo por RsmA (KsgA),<sup>86,278</sup> que actúa en la última etapa del ensamblaje de la subunidad 30S. La modificación en G1516 también es estequiométrica siendo RsmJ la enzima responsable de esta metilación en *E. coli*.<sup>85</sup> También hemos observado la estequiometría de la modificación en U1498 y mediante extensión de cebadores hemos confirmado la posición m<sup>3</sup>U y la cuantificación de la misma ha resultado mayor del 97%. La enzima responsable de esta metilación en *E. coli* es la metilasa RsmE que requiere que la subunidad 30S esté completamente ensamblada. Por último en esta región se han identificado otras dos modificaciones estequiométricas en C1402 que coinciden con las modificaciones N4 mediada por RsmH y 2'-O- mediada por RsmI en *E. coli*.<sup>82</sup> Se han localizado genes homólogos a los de *E. coli* para todas estas metilasas codificados en el genoma de la PAO1 y no se han observado otras modificaciones adicionales en las hélices 44 y 45 de *P. aeruginosa* ni se ha identificado ningún otro gen homólogo que se corresponda con otras metilasas descritas previamente.

## 2.2. Modificaciones en la diana secundaria del ARNr 23S.

En la región secundaria de unión de los aminoglucósidos, en la hélice 69, hemos determinado la presencia de modificaciones en los nucleótidos m<sup>3</sup>Ψ1915, m<sup>5</sup>U1939 y m<sup>5</sup>C1962 (Figura 26).

En primer lugar se ha observado en el genoma de PAO1 un gen homólogo al que codifica para la pseudouridina sintetasa RluD en *E. coli*, que isomeriza los nucleótidos U1911, U1915 y U1917<sup>190</sup> localizados en el bucle de la hélice 69. A su vez se ha identificado el homólogo a RlmH, que metila a U1915 posteriormente a su pseudouridilación.<sup>95,96</sup> La metilación y la pseudouridilación tienen efectos opuestos en la estructura de ARNr. Mientras que las metilaciones dificultan la aproximación a otros componentes, las pseudouridilaciones aportan un sitio extra al nucleótido para posibles interacciones electrostáticas. El bucle de la hélice 69 interacciona directamente con la hélice 44 formando un puente de unión entre la interfaz de las dos subunidades ribosomales. En todas las especies analizadas hasta la fecha se han identificado ortólogos de RlmH únicamente acompañados de RluD, siendo U1915 el único

nucleótido que está pseudouridilado y posteriormente metilado. Mediante extensión de cebadores hemos demostrado aquí la presencia de esta metilación aproximadamente en el 80% de las moléculas de ARNr lo cual se puede deber a que la metilación solamente ocurre cuando la subunidad 50S del ribosoma se acaba de ensamblar en el complejo ribosomal 70S.

También se han identificado homólogos para las metilasas de *E. coli* RlmD y RlmI, responsables de las metilaciones en m<sup>5</sup>U1939 y m<sup>5</sup>C1962,<sup>89,97,98</sup> cuyas modificaciones en *P. aeruginosa* han sido confirmadas mediante MALDI MS. Hemos observado trazas de fragmentos sin la metilación por lo que el porcentaje de metilación de las partículas de ARNr no es del 100%. Aparte de estas modificaciones en la región, no se ha evidenciado ninguna modificación más.

### **2.3. Ausencia en *P. aeruginosa* del homólogo de *RsmF* que modifica la posición m<sup>5</sup>C1407 en el ARNr 16S de *E. coli*.**

En *E. coli*, RsmF (previamente denominada YebU) lleva a cabo la modificación en m<sup>5</sup>C1407 situada en el sitio de unión primaria de los aminoglucósidos en el ARNr 16S.<sup>83</sup> En este trabajo, no hemos identificado ningún homólogo de *rsmF* en el genoma de *P. aeruginosa* resultando también ausente dicha modificación en su ARNr al realizar la espectrometría de masas MALDI. RsmF está conservado en la familia *Enterobacteriaceae* incluyendo a los géneros *Salmonella*, *Klebsiella* y *Shigella* cuyos homólogos presentan un porcentaje de identidad en aminoácidos mayor al 80% respecto al de *E. coli*. Otros órdenes como Aeromonadales, Alteromonadales y Vibrionales contienen ORFs (*open reading frames*) con una identidad de en torno al 58%. Mediante un dendrograma de Gammaproteobacteria, basado en las secuencias del ARNr 16S, se ha observado que las especies portadoras de un homólogo de *rsmF* están genéticamente relacionadas y así mismo lo están las que no lo poseen (Figura S1, pág. 137). El dendrograma que relaciona las secuencias nucleotídicas de *rsmF* también ha señalado una evolución conjunta de las bacterias y *rsmF* (Figura S1, pág. 137). *rsmF* podría haber sido adquirido por un antecesor común de las bacterias que actualmente lo portan o podría tener un origen temprano en la especiación de las bacterias Gram-negativas y que se hubiera perdido en *P. aeruginosa* mediante un

evento de delección aislado en un antecesor común. La segunda hipótesis estaría reforzada por el hecho de que *Yersinia* dentro de las enterobacterias carece de *rsmF* pudiendo también haberse delecionado en un punto determinado.

### 3. Interferencia entre metilasas intrínsecas del ribosoma y metilasas de resistencia adquiridas.

En este trabajo se ha comprobado que la adquisición de una metilación en m<sup>7</sup>G1405 mediada por una metilasa adquirida de la familia Arm/Rmt en *E. coli*, interfiere con la metilación intrínseca en m<sup>5</sup>C1407 mediada por RsmF. Hemos observado en la región del espectro [m<sup>4</sup>Cm]CC[m<sup>7</sup>G]U[m<sup>5</sup>C]ACACCAUG (C1402-G1415) en la que se localiza la metilación en la posición m<sup>7</sup>G1405, responsable de conferir resistencia a los aminoglucósidos, un segundo fragmento [m<sup>4</sup>Cm]CC[m<sup>7</sup>G]UCACACCAUG que carece de la metilación en m<sup>5</sup>C1407. El desplazamiento de la metilación intrínseca en m<sup>5</sup>C1407 había sido observado previamente por Cubrilo *et al.*<sup>279</sup> al expresar Sgm en *E. coli*. Sgm es una metiltransferasa intrínseca del actinomiceto *Micromonospora zionensis* productor de sisomicina que también metila la posición m<sup>7</sup>G1405 resultando el patrón de metilación en dicha región idéntico al de las metiltransferasas de la familia Arm/Rmt.

En el caso de *P. aeruginosa* hemos observado que en torno a la región espectral en la que se localiza la metilación en m<sup>7</sup>G1405, además del fragmento [m<sup>4</sup>Cm]CC[m<sup>7</sup>G]UCACACCAUG (C1402-G1415) con 4485 *m/z*, aparece otro pico con 14 Da menos que se corresponde con una proporción de moléculas que carecen de una de las metilaciones de la región. Puesto que la metilación en m<sup>7</sup>G1405 sigue presente y la metilación en m<sup>5</sup>C1407 no existe en *P. aeruginosa*, una de las metilaciones (2'-O- o N4-) del nucleótido C1402 está ausente en esas moléculas. Esta interferencia resulta aún más sorprendente que la anteriormente observada en *E. coli* ya que estas dos metilaciones del nucleótido C1402 están presentes en todas las especies bacterianas.

Ambos desplazamientos de metilaciones endógenas por parte de metilasas de resistencia adquiridas resultan sorprendentes dado que el ribosoma es una de las estructuras más conservadas a lo largo de la evolución.

Posteriormente a estos trabajos, Lioy *et al.*<sup>280</sup> han indicado que la metilasa adquirida NpmA, que metila m<sup>1</sup>A1408 del ARNr 16S, también desplaza a la metilación intrínseca en m<sup>5</sup>C1407. Por el contrario, han sugerido que concretamente la metilasa ArmA desplaza a la metilación endógena en C1402 mediada por RsmI en lugar de la metilación m<sup>5</sup>C1407 en *E. coli*.<sup>280</sup> Sin embargo, para justificar esta segunda afirmación, únicamente muestran un análisis mediante espectrometría de masas MALDI en tándem del fragmento GCC (posiciones 1401-1403) digerido con ARNasa-A de la cepa de *E. coli* portadora de *armA*. En la gráfica obtenida, aparece un pico compatible con la ausencia de una de las metilaciones de C1402. Al no tratarse de un análisis cuantitativo, convendría analizar el espectro completo de la región digerida con ARNasa-A para comprobar si la metilación en m<sup>5</sup>C1407 está también afectada o no. No obstante, la conclusión obtenida en nuestro trabajo también se podría extrapolar a este último estudio; las metilasas adquiridas que confieren resistencia a los aminoglucósidos son capaces de desplazar a metilaciones intrínsecas adyacentes modificando el patrón fisiológico de metilación del ribosoma altamente conservado entre bacterias.

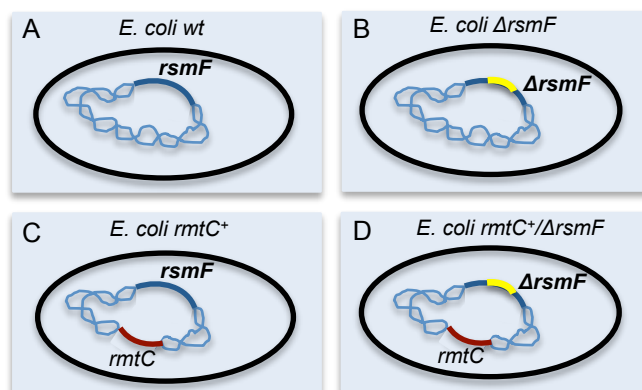
De esta manera no solo las metilasas adquiridas son capaces de metilar el 100% de las partículas ribosomales incluso en ausencia de aminoglucósidos sino que además prevalecen sobre las metilaciones endógenas adyacentes de la región reforzando la idea de la posible incorporación de estas metilaciones adquiridas de resistencia en el patrón de metilación fisiológico de la bacteria.

#### **4. Coste biológico de la adquisición de una metilasa que confiere resistencia a aminoglucósidos.**

A continuación hemos querido estudiar la importancia y el coste biológico tanto de la adquisición de una metilasa que confiere resistencia a aminoglucósidos como de la interferencia observada entre estas metilasas adquiridas y las metilasas endógenas



que contribuyen al correcto funcionamiento del ribosoma bacteriano. Para ello se ha elegido como objeto de estudio la interacción entre RmtC y RsmF ya que, como se ha señalado previamente, se ha observado una interacción equivalente entre la metilasa Sgm y RsmF<sup>279</sup> cuando esta primera se expresa en *E. coli*. El estudio de esta interacción empleando plásmidos con alto número de copias como vector de clonaje no resulta óptimo, ya que hemos comprobado que estos plásmidos son inestables cuando portan uno de los genes de la familia Arm/Rmt. Por este motivo hemos continuado con nuestro modelo, en el que insertamos *rmtC* junto a su promotor nativo en el cromosoma de *E. coli*, con el que hemos querido asemejar la manera en la que se ha observado previamente dicho gen en aislados clínicos de *Salmonella* Virchow.<sup>264</sup> Hemos observado en este modelo de *E. coli*, como ya se comentó anteriormente, que la metilación en m<sup>7</sup>G1405 esta presente incluso en ausencia de antibióticos y hemos comprobado que el desplazamiento de la metilación intrínseca en m<sup>5</sup>C1407 también tiene lugar. Por este motivo, hemos decidido seguir adelante con dicho modelo y hemos realizado todas nuestras construcciones en la cepa de *E. coli* BW25113 (Figura 27).



**Figura 27.** Cepa de *E. coli* BW25113, portadora de *rsmF* de manera intrínseca, y mutantes realizados a partir de la misma. En dichos mutantes se ha insertado el gen que codifica para la metilasa adquirida RmtC y/o se ha deleciónado *rsmF*.

En primer lugar, para analizar las consecuencias de la pérdida de metilación en m<sup>5</sup>C1407 se ha deleciónado el gen que codifica para la metilasa endógena RsmF. En ensayos de competición entre la cepa de *E. coli* y la cepa de *E. coli* con *rsmF* deleciónado se ha observado una reducción del fitness del 7,7% por cada 10 generaciones para esta segunda, por lo que su desventaja competitiva frente a la cepa original indica la importancia de esta metilación endógena para la bacteria a nivel fisiológico. A continuación, se ha querido estudiar si en ausencia de *rsmF*, la adquisición de una metilación en m<sup>7</sup>G1405 podía compensar la desventaja competitiva

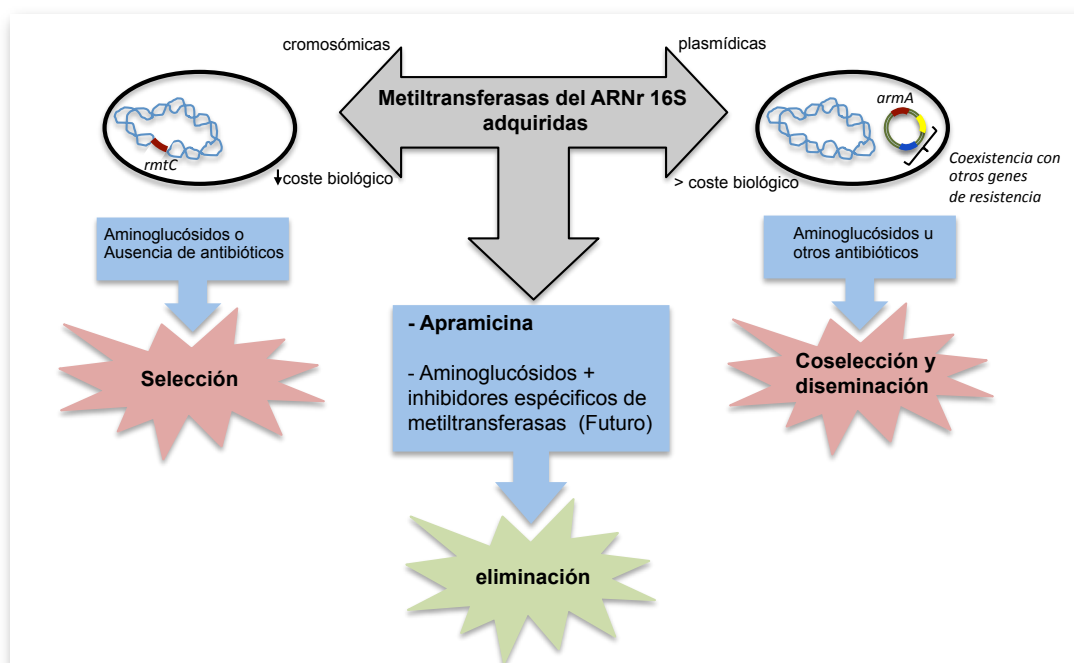
de haber perdido esta metilación en m<sup>5</sup>C1407. Se ha determinado que la cepa que carece de *rsmF* pero porta *rmtC* presenta una desventaja competitiva del 6% por cada 10 generaciones frente a la cepa de *E. coli* silvestre con lo cual se ha concluido que aún no produciéndose una compensación completa de la metilación endógena, la adquisición de una metilasa de resistencia no supone un coste biológico adicional para la bacteria. A raíz de esta observación, se ha querido predecir si los genes de la familia Arm/Rmt serían o no seleccionados en ausencia de presión antibiótica. Se han llevado a cabo experimentos de competición entre la cepa de *E. coli* y *E. coli rmtC*<sup>+</sup>, lo que ha evidenciado una desventaja competitiva de la cepa portadora de *rmtC* muy baja, 0,39% por cada 10 generaciones. En cuanto a la competición entre las cepas de *E. coli* con *rsmF* delecionado con y sin *rmtC*, la cepa portadora de *rmtC* ha presentado también una desventaja competitiva baja, de 0,69% por cada 10 generaciones, frente a la que no lo porta. Estas observaciones determinan que la interferencia de RmtC con la metilasa endógena RsmF no supone un aumento del coste biológico y por ello el gen de resistencia es capaz de persistir incluso en ausencia de la selección del mismo. Además, el hecho de que este desplazamiento no suponga un coste adicional para la bacteria refuerza la hipótesis de la posible evolución del ribosoma hacia uno que a la acción de los aminoglucósidos, una selección incluso en ausencia de dichos antibióticos y una posterior diseminación de bacterias con ribosomas más resistentes.

Posteriormente a este trabajo, Lioy *et al.* han observado que la adquisición mediada por un plásmido de NpmA, que metila la posición m<sup>1</sup>A1408 del ARNr 16S, desplaza también a la metilación endógena en m<sup>5</sup>C1407, mediada por RsmF, sin suponer un coste adicional para la bacteria.<sup>280</sup> Esto favorecería la persistencia de dicho gen de resistencia incluso en ausencia de aminoglucósidos. No obstante dicha metiltransferasa no se ha vuelto a identificar en ningún aislado clínico. La explicación de este fenómeno podría deberse a que el plásmido en el que se describió por primera y única vez NpmA no portaba más genes de resistencia pudiendo haber limitado su diseminación al no haberse coseleccionado con otros antibióticos de uso común en clínica.

Además, Lioy *et al.*<sup>280</sup> establecen que ArmA, que metila la posición m<sup>7</sup>G1405, infiere un coste biológico en la bacteria cuando se encuentra formando parte de un plásmido.<sup>280</sup> Este hecho lleva a pensar que la alta prevalencia de *armA* mediada por

plásmidos en cepas clínicas se debe principalmente a su coexistencia con otros mecanismos de resistencia, principalmente frente a  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas. Por tanto, la selección y posterior diseminación de dichos plásmidos portadores de múltiples genes de resistencia puede haberse visto favorecida por el empleo de estas dos últimas familias de antibióticos muy comunes en la práctica clínica. Asimismo, hemos observado la coexistencia de *armA*, *rmtC* o *rmtB* junto con *rmtF* así como *armA* junto con *rmtB* o *rmtC* en una misma cepa.<sup>199,265,266</sup> Sería por tanto interesante estudiar la relación que tienen dichos genes entre si y de que manera su coexistencia en la misma cepa resulta o no ventajosa para la bacteria.

Por lo tanto, concluimos que la selección exitosa de estos genes se debe básicamente a dos estrategias: la inserción de dichos genes en el cromosoma bacteriano de manera que su bajo coste permite una selección de los mismos incluso en ausencia de aminoglucósidos; o bien a través de plásmidos transferibles que portan múltiples genes de resistencia a otros antibióticos de uso común que, al emplearse en el tratamiento de infecciones, favorecen su coselección (Figura 28).



**Figura 28.** Selección exitosa de las metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S y tratamientos alternativos para evitar dicha selección y posterior diseminación.

## 5. Papel de la metilasa endógena RsmF en la susceptibilidad intrínseca a los aminoglucósidos en *E. coli*.

Hemos observado que la cepa de *E. coli* en la que hemos delecionado *rsmF* presenta una CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) mayor a aminoglucósidos. Así mismo la CMI de la cepa de *E. coli* con *rmtC* insertado en el cromosoma y *rsmF* delecionado también es mayor a la de la cepa de *E. coli* que porta ambos genes. Por tanto éstas diferencias en la CMI se deben a la ausencia de la metilación en m<sup>5</sup>C1407. Además el aumento de la CMI también se ha observado en apramicina y neomicina además de en los 4,6-2-DOS (kanamicina, tobramicina, arbekacina y gentamicina) que son a los que afecta y confiere resistencia la metilación adquirida en m<sup>7</sup>G1405.

Por tanto la ausencia de la metilación en m<sup>5</sup>C1407 parece desestabilizar el contacto entre los aminoglucósidos y su sitio de unión en el ribosoma dando lugar a un aumento de resistencia a los mismos. Esto significa que la metilación en m<sup>5</sup>C1407 está implicada en la unión directa o indirecta de los aminoglucósidos con su diana. Con dicha observación, también se podría concluir que la adquisición de RmtC confiere resistencia a aminoglucósidos tanto por la acción directa de la metilación en m<sup>7</sup>G1405 en el ARNr 16S como por el efecto indirecto derivado del desplazamiento de la metilación intrínseca en m<sup>5</sup>C1407.

## 6. Origen de las metiltransferasas adquiridas.

El contenido en G+C de las metilasas adquiridas descritas hasta hoy resulta muy variado oscilando entre el 30 y el 67%. En cambio, el contenido en G+C tanto del genoma de los actinomicetos productores de aminoglucósidos como el de sus metilasas intrínsecas que confieren resistencia a los mismos es superior, estando comprendido entre 65-75% (Tabla 6). A día de hoy, el origen de las metilasas adquiridas permanece incierto aunque se ha sugerido que la clave de los orígenes podría hallarse en bacterias ambientales de menor contenido en G+C como *Bacillus circulans*, productora de butirosina, cuyo contenido en G+C es del 30%. En un intento de demostrar esta hipótesis, se ha comprobado que ArmA es activa en *Bacillus*

*subtilis*<sup>241</sup> y RmtC es activa en *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.<sup>242</sup> De esta forma se ha demostrado la eficacia de estas metiltransferasas en dichos géneros.

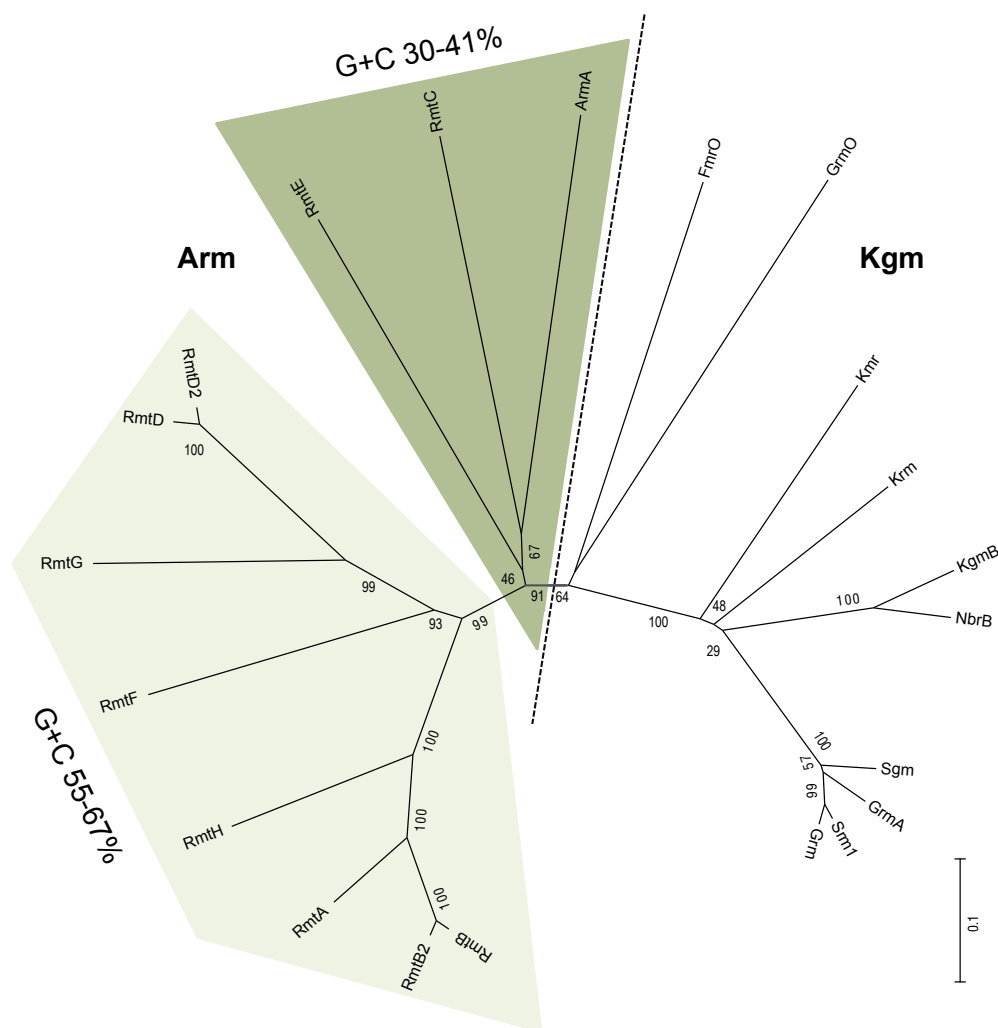
Como se ha indicado anteriormente, la estructura global de las metilasas de los actinomicetos productores de aminoglucósidos y la de las metilasas adquiridas por bacterias patógenas que metilan en G1405 se encuentra altamente conservada. Es por tanto que la duda acerca de si las metilasas de bacterias patógenas se han adquirido o no mediante transferencia horizontal a través de los actinomicetos productores surge únicamente a raíz de sus diferencias en el contenido en G+C.

La tabla 6, muestra el contenido en G+C de las metilasas intrínsecas y adquiridas así como el contenido en G+C de los genomas de actinomicetos ambientales y bacterias patógenas. Aunque el contenido en G+C de la primera metilasa adquirida descrita, ArmA, resultó ser del 30%, el contenido en G+C de metilasas adquiridas descritas recientemente, RmtF, RmtG y RmtH, es superior al 60%. Paralelamente, el contenido en G+C del genoma de las especies patógenas en las que se ha descrito la presencia de metilasas adquiridas oscila entre un 39% (*A. baumannii* y *P. mirabilis*) y un 66% (*P. aeruginosa*). Además, cabe destacar que en el dendrograma de la figura 29, las metilasas adquiridas con menor contenido en G+C (ArmA, RmtE y RmtC) se agrupan en una misma rama, que a su vez diverge en tres ramas diferentes, mientras que el resto de metilasas con mayor contenido en G+C se agrupan en otra rama. Por tanto, es posible que las metilasas de bacterias patógenas se hayan adquirido en varios eventos diferentes. De esta manera, bacterias de los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, ampliamente distribuidas en la naturaleza y presentes en el suelo, podrían haber adquirido estas metilasas a través de los actinomicetos productores de aminoglucósidos. Una vez adquiridas, estos patógenos pueden haber actuado como reservorio de dichas metilasas, evolucionado el contenido en G+C de las mismas adaptándolo al de su propio genoma, y posteriormente éstas se hayan diseminado entre las diferentes especies patógenas.

Tabla 6. Metilinas del ARNr 16S adquiridas e intrínsecas que confieren altos niveles de resistencia a aminoglucósidos.

Grupo metilo	Fenotipo de resistencia	Familia MTasa	Gen	Código GenBank	Contenido G+C	Especie	Bacteria	Contenido G+C
m <sup>1</sup> G1405	R+ 4,6-DOS (a todos)	Kgm (Intrínsecas)	<i>kmr</i>	BAD20767		<i>S. kanamyceticus</i>	Actinomicetos	
			<i>kgmB</i>	AAB20100		<i>S. tenebrarius</i>	productores de aminoglucósidos	
			<i>nbrB</i>	AAB95477		<i>S. hindustanus</i>	(Gram +)	
			<i>srml</i>	AAV28394		<i>M. inyonensis</i>		≈ 70%
			<i>grm</i>	AAR98541		<i>M. rosea</i>		
			<i>grmA</i>	AAR98546		<i>M. echinospora</i>		
			<i>sgm</i>	3LCU_A		<i>M. zionensis</i>		
			<i>grmO</i>	Q2J7L5		<i>M. echinospora</i>		
			<i>fmrO</i>	BAA02451		<i>M. olivasterospora</i>		
			<i>Krm</i>	YP 482546		<i>Frankia sp.</i>		
			<i>armA</i>	ACL27951	30%	<i>Enterobacteriaceae</i> ,	Patógenos y	<i>Enterobacteriaceae</i> 50-59%
			<i>rmtE</i>	ADA63498	37%	<i>A. baumannii</i> y	patógenos	<i>P. mirabilis</i> ( <i>Enterobacteriaceae</i> ) 39%
			<i>rmtC</i>	BAE48305	41%	<i>P. aeruginosa</i>	oportunistas	<i>P. stuartii</i> ( <i>Enterobacteriaceae</i> ) 41%
m <sup>1</sup> A1408	R+ Apramicina 4,5-DOS 4,6-DOS (Kanamicina)	Kam (Intrínsecas)	<i>rmtA</i>	BAD12551	55%		(Gram -)	<i>A. baumannii</i> 39%
			<i>rmtB</i>	BAC81971	56%			<i>P. aeruginosa</i> 66%
			<i>rmtB2</i>	AFC75738	56%			
			<i>rmtD</i>	ABJ53409	59%			
			<i>rmtD2</i>	ADW66545	59%			
			<i>rmtG</i>	AGE00988	60%			
			<i>rmtH</i>	AGH19769	61%			
			<i>rmtF</i>	AGC82133	67%			
			<i>kamA</i>	CAH60147		<i>S. tenjimariensis</i>	Actinomicetos	
			<i>kamB</i>	P25920ny		<i>S. tenebrarius</i>	productores de aminoglucósidos	
			<i>kamB2</i>	Q2MEY3	≈ 70%	<i>S. hindustanus</i>	(Gram +)	≈ 70%
			<i>cmnU</i>	ABR67761		<i>S. mutabilis</i>		
			<i>kmrSc</i>	ACB88605	≈ 70%	<i>S. cellulosum</i>	Mixobacteria que degrada celulosa	≈ 70%
R	4,6-DOS (Gentamicina)	Pam (Adquiridas)	<i>npmA</i>	BAF80809	34%	<i>E. coli</i>	Patógeno	51%
							(Gram -)	

R+, resistencia alta; R, resistencia baja.



**Figura 29. Dendrograma de las metiltransferasas del ARNr 16S de las familias Arm (adquiridas) y Kgm (intrínsecas) que metilan m<sup>7</sup>G1405.** Aparecen recuadradas las metiltransferasas adquiridas por bacterias patógenas con un menor contenido en G+C (verde oscuro) y las que poseen un mayor contenido en G+C (verde claro).

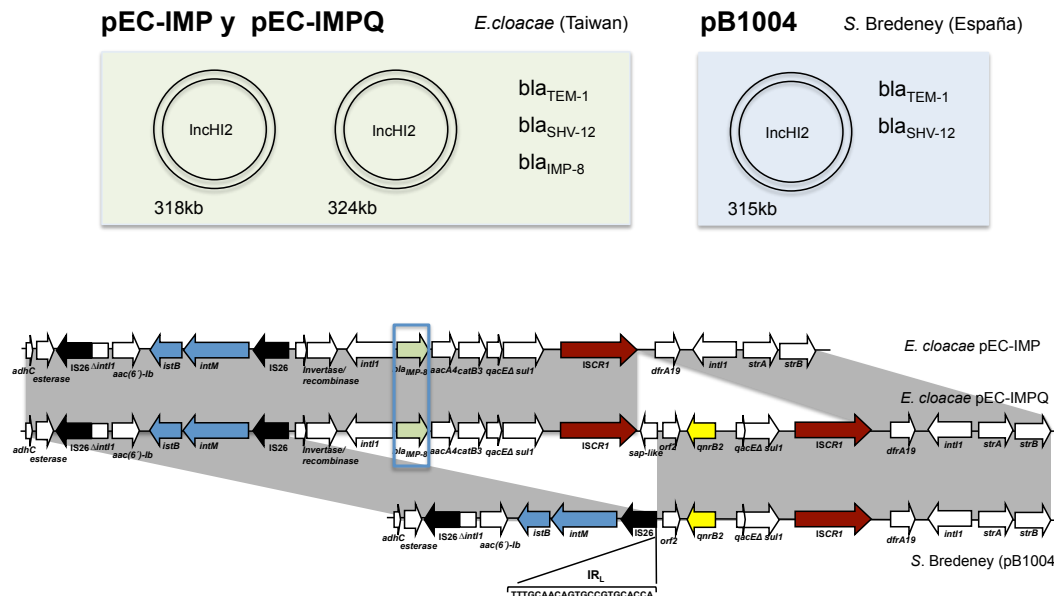
## 7. QnrB2 y su entorno genético.

Hemos identificado un plásmido conjugativo de 315 kb, pB1004, en un aislado clínico de *Salmonella* Bredeney en España. Dicho plásmido está relacionado genéticamente con los plásmidos pEC-IMP y pEC-IMPQ, de 318 y 324 kb respectivamente, descritos en Taiwan en aislados clínicos de *Enterobacter cloacae*<sup>281</sup> (Figura 30). Se trata de plásmidos del grupo de incompatibilidad IncHI2. Estos dos últimos plásmidos portan genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas IMP-8, SHV-12 y

TEM-1. La diferencia principal entre los dos plásmidos aislados en Taiwan es la ausencia en el plásmido pEC-IMP de un fragmento de 5,8 kb que contiene el gen *qnrB2* acompañado de ISCR1, responsable de su movilización mediante la transposición en círculo rodante. En cambio, pB1004 sí que porta *qnrB2* pero el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa IMP-8 está ausente. Esto se debe a que se ha deletado un fragmento de aproximadamente 9 kb, que contenía dicho gen, movilizándose también a través de ISCR1.

Lo que ha resultado más significativo es el hallazgo en los tres plásmidos de dos genes homólogos a genes localizados en el cromosoma de la bacteria marina *Marinobacter aquaeolei* VT8. Esto nos hace pensar que el origen de *qnrB2* pueda provenir de bacterias marinas teniendo en cuenta que ya se habían descrito previamente genes homólogos a *qnrA*, otro gen la familia *qnr*, en *Shewanella algae*.<sup>282</sup> La explicación podría deberse a que hoy en día las quinolonas, además de emplearse ampliamente en medicina humana, se emplean extensamente en acuicultura al tratarse de moléculas sintéticas estables en medio acuático.<sup>283</sup> Por tanto, concentraciones subinhibitorias de dichos antibióticos en el agua favorecerían la selección de este mecanismo de resistencia pudiendo servir las bacterias marinas como reservorio de dichos genes para posteriormente transferirse a enterobacterias.





**Figura 30. Representación esquemática del entorno genético de *qnrB2* en pB1004 y su región homóloga en los plásmidos pEC-IMP y pEC-IMPQ.** Las regiones sombreadas en azul indican una identidad  $\geq 99\%$ . Los genes homólogos a los de la bacteria marina *Marinobacter aquaeolei* VT8 aparecen señalados en azul.

## 8. Importancia de este trabajo y perspectivas.

En esta tesis doctoral se aborda en profundidad el estudio e implicaciones a nivel biológico y molecular de un mecanismo que confiere altos niveles de resistencia a aminoglucósidos, las metilasas adquiridas del ARNr 16S. Dicho mecanismo emergente en el momento del comienzo de esta tesis, continúa a día de hoy cobrando importancia debido a su expansión a lo largo de estos últimos años hacia diferentes sectores que a su vez están estrechamente conectados: salud pública, sanidad animal, industria alimentaria y medio ambiente. La labor de detección y vigilancia de este mecanismo ha sido muy extensa de manera que se ha llevado a cabo una monitorización coordinada en aislados de origen humano, animal y alimentario con el fin de abordar el problema, establecer conexiones y tratar de implantar soluciones que frenen su expansión. En primer lugar, en salud pública es donde ha supuesto una mayor relevancia encontrándose principalmente aislados hospitalarios humanos y más recientemente en aislados de animales de compañía enfermos.<sup>198-201,284</sup> En segundo lugar, ha sido detectado en animales de producción incluyendo a pollos, ganado

porcino y vacuno y su entorno.<sup>198</sup> Por último, ha sido identificado recientemente en alimentos.<sup>264,285</sup> Estos aislados en su mayoría, además de ser portadores de dicho mecanismo, también lo son de múltiples mecanismos de resistencia adicionales que en numerosas ocasiones están mediados por plásmidos.<sup>198</sup> Este hecho facilita la transferencia horizontal de estos mecanismos de resistencia entre bacterias favoreciendo su diseminación y reduciendo cada vez más el espectro de actuación de los antibióticos.

Con este trabajo se ha querido por una parte desentrañar el mecanismo molecular de las metilasas adquiridas del ARNr 16S que confieren resistencia a aminoglucósidos y estudiar el coste biológico que supone para la bacteria la adquisición de dicho mecanismo con el fin de entender su rápida expansión. Por otra parte, hemos estudiado la arquitectura de la diana de estos antibióticos en especies bacterianas, concretamente completado la de *E. coli* y estudiado por primera vez la de *P. aeruginosa*, que causan infecciones en las cuales los aminoglucósidos son el tratamiento de primera elección y en las que este mecanismo de resistencia está cada vez más extendido.

### ***8.1. Implicaciones de las interacciones entre metilasas adquiridas y endógenas en la selección y evolución hacia un ribosoma bacteriano resistente a aminoglucósidos.***

Con este estudio se ha concluido que la adquisición de una metilasa de resistencia a aminoglucósidos codificada en el cromosoma bacteriano no supone un coste biológico adicional para la bacteria y que además metila de manera estequiométrica m<sup>7</sup>G1405 al no existir evidencia de metilaciones parciales en las moléculas de ARNr analizadas. Uno de los hallazgos más sorprendentes ha sido la observación de interferencias entre estas metilaciones adquiridas, incluso en ausencia de aminoglucósidos, y modificaciones endógenas que juegan un papel importante en el correcto funcionamiento del ribosoma. No obstante, la reducción de la modificación intrínseca de RsmF en m<sup>5</sup>C1407 en el ARNr de *E. coli* en presencia de las metilasas de resistencia adquiridas de m<sup>7</sup>G1405 no supone una reducción en el fitness de la

bacteria. Por otro lado, la reducción de una de las metilaciones intrínsecas de C1402, 2'-O- o N4, en presencia de la metilasa de m<sup>7</sup>G1405 RmtD en *P. aeruginosa* resulta aún más sorprendente al estar RsmH y RsmI, enzimas responsables de las metilaciones en C1402, mucho más conservadas que RsmF. No obstante aún no hemos comprobado si el coste biológico de esta interacción observada en *P. aeruginosa* es en este caso mayor. Dado que el ribosoma es una estructura altamente conservada en los seres vivos, el hecho de que haya una interacción en la cual las metilasas de resistencia adquiridas se antepongan a metilaciones endógenas conservadas del ribosoma resulta de gran relevancia dado que podría implicar la selección y mantenimiento de estas metilasas de resistencia adquiridas pudiendo evolucionar el ribosoma hacia uno con mayor resistencia a antibióticos.

## **8.2. Estudio de la arquitectura del sitio de unión de los aminoglucósidos en *P. aeruginosa* para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas.**

Dentro de los aislados hospitalarios se ha observado en Brasil una alta prevalencia de *P. aeruginosa* coproductora de la metalo- $\beta$ -lactamasa SPM-1 y la metilasa de resistencia a aminoglucósidos RmtD confiriendo ésta última altos niveles de resistencia a tobramicina.<sup>262</sup> La tobramicina es un aminoglucósido cuyo uso está muy extendido en el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*, principalmente en pacientes con fibrosis quística, en donde este patógeno causa frecuentemente complicaciones pulmonares. Aproximadamente el 60% de los pacientes con fibrosis quística a los 20 años de edad están infectados con *P. aeruginosa* de manera crónica.<sup>166</sup> El tratamiento con tobramicina prolonga la expectativa de vida de los pacientes reduciendo la intensidad de las infecciones aunque no consigue su erradicación. El rol que juega este antibiótico en este tipo de infecciones resulta crucial a día de hoy así como en un futuro inmediato. La importancia del uso de aminoglucósidos en *P. aeruginosa* sumado a la adquisición de mecanismos que confieren altos niveles de resistencia a los mismos nos ha llevado a abordar un estudio detallado de la diana de unión de los aminoglucósidos en el ARNr 16S y 23S de *P. aeruginosa*. El conocimiento de la arquitectura de estas dianas ha sido un primer paso ineludible que permite encaminarnos hacia un diseño racional de nuevos aminoglucósidos con una eficacia mayor frente a este patógeno. Además, el

conocer de manera exhaustiva los mecanismos de resistencia permite dirigir el diseño de nuevos agentes antimicrobianos hacia unos que impidan dichos mecanismos permitiendo a su vez recuperar el uso de antibióticos que a día de hoy siguen siendo imprescindibles.

### ***8.3. Descubrimiento de nuevos antibióticos, recuperación de viejos aminoglucósidos y/o restauración de la sensibilidad frente a los mismos.***

A pesar del amplio espectro y gran eficacia de los aminoglucósidos, éstos han sido desplazados del uso clínico en gran medida debido a sus efectos adversos. De esta manera, el último aminoglucósido introducido en clínica fue hace veinte años. Actualmente, la **plazomicina**, derivado de la sisomicina, se encuentra en desarrollo clínico en fase II. Éste no ha reportado nefrotoxicidad ni ototoxicidad por el momento siendo dichos efectos adversos el factor limitante en el uso de los aminoglucósidos, ya que por lo demás estos antibióticos resultan muy eficaces. No obstante, aunque las cepas portadoras de enzimas modificadoras de aminoglucósidos han resultado ser sensibles a la plazomicina, ésta no ha resultado eficaz frente a cepas portadoras de metilasas del ARNr 16S que confieren resistencia a aminoglucósidos.<sup>121</sup>

Por otro lado, la **apramicina**, aminoglucósido descubierto en 1968 y cuyo uso se ha restringido exclusivamente al ámbito veterinario, ha mostrado una clara disociación entre su actividad frente al ribosoma bacteriano y mitocondrial, siendo muy baja frente al segundo y por consiguiente con efectos tóxicos significativamente menores.<sup>173</sup> A su vez, cabe destacar que las metiltransferasas del ARNr 16S ampliamente distribuidas en bacterias patógenas (aquellas que metilan en G1405) no confieren resistencia a apramicina. De esta manera la apramicina podría ser el candidato idóneo a emplear tanto en el caso de observar un fenotipo compatible con una metiltransferasa de esta familia o directamente podría reintroducirse como antibiótico de primera elección a nivel clínico en medicina humana (Figura 28). Ésta podría sustituir a otros antibióticos de uso común, tales como los  $\beta$ -lactámicos o las fluoroquinolonas, que han favorecido la coselección de cepas con múltiples genes de resistencia, incluyendo a las metilasas de resistencia a aminoglucósidos, en los últimos años.

Así mismo, resulta necesario resaltar que debido a la gran eficacia de los antibióticos cuya diana es el ribosoma bacteriano, el estudio del ribosoma y su biogénesis resulta clave para el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos. Además, la posibilidad de bloquear mecanismos de resistencia que alteran químicamente el ribosoma, como por ejemplo mediante el empleo de **inhibidores específicos de las metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S**, podría restaurar la sensibilidad frente a los aminoglucósidos (Figura 28, pág. 159). Por tanto, también es clave el estudio de las regiones específicas de la estructura de estas metilasas adquiridas que puedan servir como posibles dianas para inhibidores específicos sin afectar al resto de metilasas endógenas necesarias para un correcto funcionamiento de la maquinaria bacteriana. Un estudio de los residuos de las metiltransferasas m<sup>7</sup>G llevado a cabo por Husain *et al.*<sup>245</sup> ha revelado que los residuos clave de unión al cofactor AdoMet y su modo de unión están conservados entre las m<sup>7</sup>G. Sin embargo, han identificado que los residuos de unión al sustrato es decir, los implicados en la unión a la guanosina, son específicos para cada grupo de metiltransferasas de m<sup>7</sup>G (Tabla 5, pág. 97). Por tanto, la presencia de residuos específicos comunes para las metiltransferasas de m<sup>7</sup>G1405, incentiva a la búsqueda de inhibidores específicos que, presumiblemente, no van a interferir con otras metiltransferasas fisiológicas de residuos m<sup>7</sup>G; como por ejemplo Ecm1, metiltransferasa del cap 0 del ARNm, esencial en las células humanas. Se ha sugerido como posible diana, el aminoácido estrictamente conservado R87 de RmtB<sup>244</sup> (R108 en Sgm) que se encuentra en el dominio N2-terminal de unión específica al sustrato de ARNr de las metilasas del m<sup>7</sup>G1405 y además mantiene contacto con el cofactor AdoMet. El residuo K174 en RmtB (K199 en Sgm) que pertenece al motivo IV de la región C-terminal, también se ha estimado como específico de unión al ARNr.<sup>244,245</sup>

Cabe destacar que en la figura 28 se sugieren estas dos últimas alternativas, es decir, el empleo de la apramicina y el diseño de inhibidores específicos de las metiltransferasas de resistencia, como forma de frenar la selección y diseminación de dichas metilasas y a su vez impedir la coselección de otros mecanismos de resistencia frente a antibióticos comúnmente empleados en la actualidad.





# Conclusiones

Imagen: Estatua en la Plaza de Toros de Las Ventas de Madrid en honor a Alexander Fleming por el descubrimiento de la penicilina. Escultor, Emilio Laíz Campos.



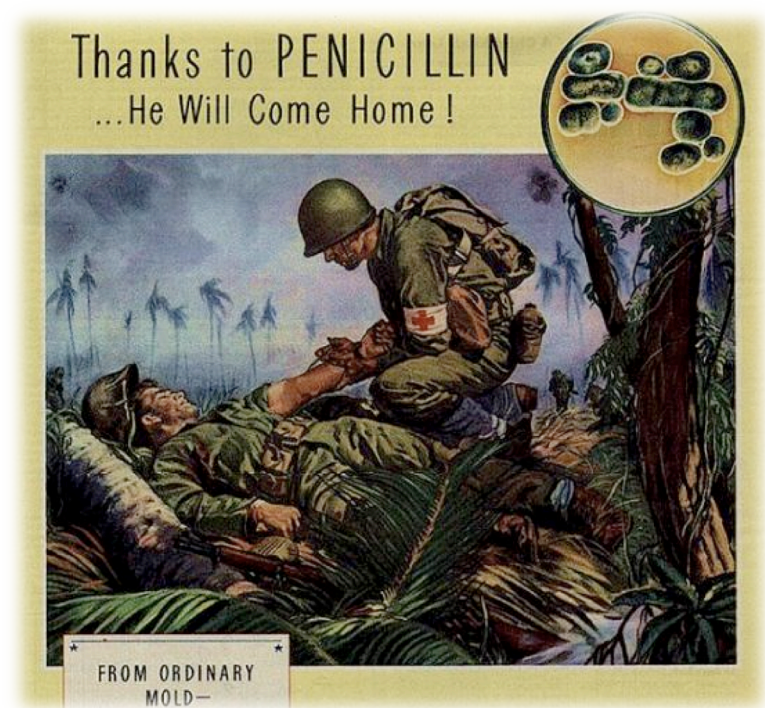
## CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son las enumeradas a continuación:

1. ArmA, RmtB y RmtC, las metiltransferasas adquiridas de mayor prevalencia que confieren resistencia a aminoglucósidos, metilan de forma estequiométrica m<sup>7</sup>G1405 en el ARNr 16S impidiendo a su vez la metilación intrínseca en m<sup>5</sup>C1407 mediada por RsmF en *E. coli*.
2. Al insertar *rmtC* junto a su promotor nativo en el cromosoma de *E. coli* obtenemos la metilación estequiométrica de la posición m<sup>7</sup>G1405 del ARNr 16S incluso en ausencia de aminoglucósidos.
3. Hemos observado que la pérdida de la metilación intrínseca en m<sup>5</sup>C1407 supone una reducción en el fitness. Sin embargo, ni la adquisición a nivel cromosómico de *rmtC*, ni las interacciones producidas entre las metilaciones en m<sup>7</sup>G1405 y m<sup>5</sup>C1407 suponen un coste biológico adicional para la bacteria.
4. En ausencia de la metilación fisiológica en m<sup>5</sup>C1407 mediada por RsmF en la región de unión a los aminoglucósidos en el ARNr 16S de *E. coli*, la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de los aminoglucósidos aumenta demostrando que dicha metilación fisiológica participa en la unión de los aminoglucósidos a su diana.
5. Hemos estudiado en *P. aeruginosa* las modificaciones post-transcripcionales presentes en las regiones de unión a los aminoglucósidos en la H44 del ARNr 16S y en la H69 del ARNr 23S y regiones adyacentes. Hemos observado la ausencia de metilación en la posición m<sup>5</sup>C1407 del ARNr 16S así como la de un gen homólogo a *rsmF* en el cromosoma.

6. RmtD, en *P. aeruginosa*, metila de forma estequiométrica el residuo m<sup>7</sup>G1405 del ARNr 16S confiriendo alto nivel de resistencia a aminoglucósidos e impidiendo a su vez una de las dos metilaciones intrínsecas en C1402, conservadas en todas las especies bacterianas.

7. QnrB2, mecanismo emergente de resistencia a fluoroquinolonas, está presente en un aislado clínico de *Salmonella* Bredeney de España, en un plásmido conjugativo IncHI2 asociado a las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 y SHV-12 y a la enzima modificadora de aminoglucósidos AAC-6-Ib. El entorno de *qnrB2* es nuevo y contiene dos genes homólogos también localizados en el cromosoma de la bacteria marina *Marinobacter aquaeolei* VT8, sugiriendo un posible origen marino de *qnrB2*.



*Conclusions*

Imagen: Anuncio de la penicilina de Schenley Laboratories Inc., Research and Development Division, Lawrenceburg, Indiana, EE.UU, 1944.

## CONCLUSIONS

The conclusions of this Doctoral thesis are as follow:

1. ArmA, RmtB and RmtC, the most prevalent acquired aminoglycoside resistance methyltransferases, stoichiometrically methylate residue m<sup>7</sup>G1405 in the 16S rRNA impeding an endogenous methylation mediated by RsmF in the m<sup>5</sup>C1407 position in *E. coli*.
2. The integration of *rmtC* and its native promoter into the chromosome of *E. coli* results in the stoichiometric methylation of the 16S rRNA m<sup>7</sup>G1405 even in the absence of aminoglycosides.
3. We have observed that the loss of the housekeeping methylation at m<sup>5</sup>C1407 entails a reduction in the bacterial fitness. However, neither the chromosomal acquisition of the m<sup>7</sup>G1405 aminoglycoside resistance gene, *rmtC*, nor the interaction between methylations at m<sup>7</sup>G1405 and m<sup>5</sup>C1407 have a pronounced fitness cost.
4. In the absence of the intrinsic methylation in the 16S rRNA at m<sup>5</sup>C1407, the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) of aminoglycosides in *E. coli* is increased, indicating the involvement of this methylation in aminoglycoside binding.
5. We have characterised the post-transcriptional modifications in the aminoglycoside binding sites of *P. aeruginosa* rRNAs including H44 of the 16S rRNA and H69 of the 23S rRNA as well as adjacent regions confirming the absence of the methylation at m<sup>5</sup>C1407 in the 16S rRNA and *rsmF* homologous.

6. The acquisition of RmtD in *P. aeruginosa* stoichiometrically modifies m<sup>7</sup>G1405 conferring high-level aminoglycoside resistance, whereby impeding one of the intrinsic methylations at C1402, conserved among all Bacteria.

7. QnrB2, an emerging resistance mechanism to fluoroquinolones, is present in a *Salmonella Bredeney* clinical isolate, within an IncHI2 conjugative plasmid associated to the  $\beta$ -lactamases TEM-1 and SHV-12 and the aminoglycoside modifying enzyme AAC-6-Ib. The novel genetic environment of *qnrB2* contains two homologous genes also found in the chromosome of the marine bacteria *Marinobacter aquaeolei* VT8, constituting a potential marine origin.



## Bibliografía

Imagen: Campaña actual para uso responsable de antibióticos del Ministerio de Sanidad y Consumo de España.



## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Poehlsgaard, J. & Douthwaite, S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol* **3**, 870-881 (2005).
- 2 Bremer, H. & Dennis, P. P. Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. 1553-1569 (ASM Press, 1996).
- 3 Lake, J. A. Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *J Mol Biol* **105**, 131-139 (1976).
- 4 Tischendorf, G. W., Zeichhardt, H. & Stoffer, G. Architecture of the *Escherichia coli* ribosome as determined by immune electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4820-4824 (1975).
- 5 Pape, T., Stark, H., Matadeen, R., Orlova, E. V. & Van Heel, M. in *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions* (ed R. A. et al. Garrett) 37-44 (2000).
- 6 Agrawal, R. K. & Frank, J. Structural studies of the translational apparatus. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 215-221 (1999).
- 7 Frank, J. et al. The role of tRNA as a molecular spring in decoding, accommodation, and peptidyl transfer. *FEBS Lett* **579**, 959-962 (2005).
- 8 Valle, M. et al. Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol* **10**, 899-906 (2003).
- 9 Yonath, A., Mussig, J. & Wittmann, H. G. Parameters for crystal growth of ribosomal subunits. *J Cell Biochem* **19**, 145-155 (1982).
- 10 Trakhanov, S. et al. Preliminary X-ray investigation of 70 S ribosome crystals from *Thermus thermophilus*. *J Mol Biol* **209**, 327-328 (1989).
- 11 Von Bohlen, K. et al. Characterization and preliminary attempts for derivatization of crystals of large ribosomal subunits from *Haloarcula marismortui* diffracting to 3 Å resolution. *J Mol Biol* **222**, 11-15 (1991).
- 12 Yusupov, M. M., Garber, M. B., Vasiliev, V. D. & Spirin, A. S. *Thermus thermophilus* ribosomes for crystallographic studies. *Biochimie* **73**, 887-897 (1991).
- 13 Wimberly, B. T. et al. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327-339 (2000).
- 14 Schlueder, F. et al. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* **102**, 615-623 (2000).
- 15 Yusupov, M. M. et al. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**, 883-896 (2001).
- 16 Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H. & Noller, H. F. The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* **106**, 233-241 (2001).
- 17 Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920 (2000).
- 18 Harms, J. et al. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**, 679-688 (2001).
- 19 Vila-Sanjurjo, A. et al. X-ray crystal structures of the WT and a hyper-accurate ribosome from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8682-8687 (2003).
- 20 Ben-Shem, A. et al. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**, 1524-1529 (2011).
- 21 Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A. & Ban, N. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* **331**, 730-736 (2011).
- 22 Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S. & Ban, N. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science* **334**, 941-948 (2011).
- 23 Noller, H. F., Hoffarth, V. & Zimniak, L. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* **256**, 1416-1419 (1992).
- 24 Green, R., Switzer, C. & Noller, H. F. Ribosome-catalyzed peptide-bond formation with an A-site substrate covalently linked to 23S ribosomal RNA. *Science* **280**, 286-289 (1998).
- 25 Bashan, A. et al. Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Mol Cell* **11**, 91-102 (2003).

- 26 Moore, P. B. & Steitz, T. A. The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu Rev Biochem* **72** (2003).
- 27 Sievers, A., Beringer, M., Rodnina, M. V. & Wolfenden, R. The ribosome as an entropy trap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7897-7901 (2004).
- 28 Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920-930 (2000).
- 29 Youngman, E. M., Brunelle, J. L., Kochaniak, A. B. & Green, R. The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. *Cell* **117**, 589-599 (2004).
- 30 Erlacher, M. D. *et al.* Chemical engineering of the peptidyl transferase center reveals an important role of the 2'-hydroxyl group of A2451. *Nucleic Acids Res* **33**, 1618-1627 (2005).
- 31 Klein, D. J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* **340**, 141-177 (2004).
- 32 Semrad, K., Green, R. & Schroeder, R. RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from *Escherichia coli*. *Rna* **10**, 1855-1860 (2004).
- 33 Noller, H. F. The driving force for molecular evolution of translation. *Rna* **10**, 1833-1837 (2004).
- 34 Green, R. & Noller, H. F. Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* **66**, 679-716 (1997).
- 35 Ramakrishnan, V. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**, 557-572 (2002).
- 36 Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**, 5881-5889 (1990).
- 37 Korostelev, A., Ermolenko, D. N. & Noller, H. F. Structural dynamics of the ribosome. *Curr Opin Chem Biol* **12**, 674-683 (2008).
- 38 Wintermeyer, W. *et al.* Mechanisms of elongation on the ribosome: dynamics of a macromolecular machine. *Biochem Soc Trans* **32**, 733-737 (2004).
- 39 Zaher, H. S. & Green, R. Fidelity at the molecular level: lessons from protein synthesis. *Cell* **136**, 746-762 (2009).
- 40 Kisselev, L. L. & Buckingham, R. H. Translational termination comes of age. *Trends Biochem Sci* **25**, 561-566 (2000).
- 41 Janosi, L., Hara, H., Zhang, S. & Kaji, A. Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF)--an important but overlooked step of protein biosynthesis. *Adv Biophys* **32**, 121-201 (1996).
- 42 Karimi, R., Pavlov, M. Y., Buckingham, R. H. & Ehrenberg, M. Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol Cell* **3**, 601-609 (1999).
- 43 Selmer, M., Al-Karadaghi, S., Hirokawa, G., Kaji, A. & Liljas, A. Crystal structure of *Thermotoga maritima* ribosome recycling factor: a tRNA mimic. *Science* **286**, 2349-2352 (1999).
- 44 Fourmy, D., Recht, M. I., Blanchard, S. C. & Puglisi, J. D. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* **274**, 1367-1371 (1996).
- 45 Ogle, J. M. *et al.* Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**, 897-902 (2001).
- 46 Yoshizawa, S., Fourmy, D. & Puglisi, J. D. Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science* **285**, 1722-1725 (1999).
- 47 Borovinskaya, M. A., Shoji, S., Fredrick, K. & Cate, J. H. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA* **14**, 1590-1599 (2008).
- 48 Spahn, C. M. & Prescott, C. D. Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *J Mol Med (Berl)* **74**, 423-439 (1996).
- 49 Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N. & Noller, H. F. X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* **285**, 2095-2104 (1999).
- 50 Pioletti, M. *et al.* Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *Embo j* **20**, 1829-1839 (2001).
- 51 Carter, A. P. *et al.* Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**, 340-348 (2000).
- 52 Bilgin, N., Richter, A. A., Ehrenberg, M., Dahlberg, A. E. & Kurland, C. G. Ribosomal RNA and protein mutants resistant to spectinomycin. *Embo j* **9**, 735-739 (1990).
- 53 Brink, M. F., Brink, G., Verbeet, M. P. & de Boer, H. A. Spectinomycin interacts specifically with the residues G1064 and C1192 in 16S rRNA, thereby potentially freezing this molecule into an inactive

- conformation. *Nucleic Acids Res* **22**, 325-331 (1994).
- 54 Mankin, A. S. Pactamycin resistance mutations in functional sites of 16 S rRNA. *J Mol Biol* **274**, 8-15 (1997).
  - 55 Brodersen, D. E. *et al.* The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**, 1143-1154 (2000).
  - 56 Tai, P. C., Wallace, B. J. & Davis, B. D. Actions of aurintricarboxylate, kasugamycin, and pactamycin on *Escherichia coli* polysomes. *Biochemistry* **12**, 616-620 (1973).
  - 57 Milligan, R. A. & Unwin, P. N. Location of exit channel for nascent protein in 80S ribosome. *Nature* **319**, 693-695 (1986).
  - 58 Yonath, A., Leonard, K. R. & Wittmann, H. G. A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstruction. *Science* **236**, 813-816 (1987).
  - 59 Tenson, T. & Ehrenberg, M. Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. *Cell* **108**, 591-594 (2002).
  - 60 Nakatogawa, H., Murakami, A. & Ito, K. Control of SecA and SecM translation by protein secretion. *Curr Opin Microbiol* **7**, 145-150 (2004).
  - 61 Gong, F. & Yanofsky, C. Instruction of translating ribosome by nascent peptide. *Science* **297**, 1864-1867 (2002).
  - 62 Vázquez, D. *Inhibitors of Protein Biosynthesis*. (Springer-Verlag, 1979).
  - 63 Gale, E. F., Cundliffe, E., Reynolds, P. E., Richmond, M. H. & Waring, M. J. (John Wiley and Sons, London, 1981).
  - 64 Schlunzen, F. *et al.* Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**, 814-821 (2001).
  - 65 Schlunzen, F., Pyetan, E., Fucini, P., Yonath, A. & Harms, J. M. Inhibition of peptide bond formation by pleuromutilins: the structure of the 50S ribosomal subunit from *Deinococcus radiodurans* in complex with tiamulin. *Mol Microbiol* **54**, 1287-1294 (2004).
  - 66 Thompson, J., O'Connor, M., Mills, J. A. & Dahlberg, A. E. The protein synthesis inhibitors, oxazolidinones and chloramphenicol, cause extensive translational inaccuracy in vivo. *J Mol Biol* **322**, 273-279 (2002).
  - 67 Rodnina, M. V. *et al.* Thiostrepton inhibits the turnover but not the GTPase of elongation factor G on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9586-9590 (1999).
  - 68 Belova, L., Tenson, T., Xiong, L., McNicholas, P. M. & Mankin, A. S. A novel site of antibiotic action in the ribosome: interaction of evernimicin with the large ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3726-3731 (2001).
  - 69 Kofoed, C. B. & Vester, B. Interaction of avilamycin with ribosomes and resistance caused by mutations in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3339-3342 (2002).
  - 70 Machnicka, M. A. *et al.* in *Nucleic Acids Res* Vol. 41 D262-267 (2013).
  - 71 Grosjean, H. *fine-tuning of RNA functions by modification and editing*. (Springer, 2005).
  - 72 Xu, Z., O'Farrell, H. C., Rife, J. P. & Culver, G. M. A conserved rRNA methyltransferase regulates ribosome biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 534-536 (2008).
  - 73 Connolly, K., Rife, J. P. & Culver, G. Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA. *Mol Microbiol* **70**, 1062-1075 (2008).
  - 74 Douthwaite, S. & Kirpekar, F. Identifying modifications in RNA by MALDI mass spectrometry. *Methods Enzymol* **425**, 1-20 (2007).
  - 75 Cortese, R., Kammen, H. O., Spengler, S. J. & Ames, B. N. Biosynthesis of pseudouridine in transfer ribonucleic acid. *J Biol Chem* **249**, 1103-1108 (1974).
  - 76 Wrzesinski, J., Bakin, A., Nurse, K., Lane, B. G. & Ofengand, J. Purification, cloning, and properties of the 16S RNA pseudouridine 516 synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**, 8904-8913 (1995).
  - 77 Okamoto, S. *et al.* Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol* **63**, 1096-1106 (2007).
  - 78 Lesnyak, D. V. *et al.* Methyltransferase that modifies guanine 966 of the 16 S rRNA: functional identification and tertiary structure. *J Biol Chem* **282**, 5880-5887 (2007).
  - 79 Tscherne, J. S. *et al.* Purification, cloning, and characterization of the 16S RNA m<sup>5</sup>C967 methyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 1884-1892 (1999).
  - 80 Gu, X. R., Gustafsson, C., Ku, J., Yu, M. & Santi, D. V. Identification of the 16S rRNA m<sup>5</sup>C967 methyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 4053-4057 (1999).

- 81 Tscherne, J. S., Nurse, K., Popienick, P. & Ofengand, J. Purification, cloning, and characterization of the 16 S RNA m<sup>2</sup>G1207 methyltransferase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**, 924-929 (1999).
- 82 Kimura, S. & Suzuki, T. Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA. *Nucleic Acids Res* **38**, 1341-1352 (2010).
- 83 Andersen, N. M. & Douthwaite, S. YebU is a m<sup>5</sup>C methyltransferase specific for 16S rRNA nucleotide 1407. *J Mol Biol* **359**, 777-786 (2006).
- 84 Basturea, G. N., Rudd, K. E. & Deutscher, M. P. Identification and characterization of RsmE, the founding member of a new RNA base methyltransferase family. *RNA* **12**, 426-434 (2006).
- 85 Basturea, G. N., Dague, D. R., Deutscher, M. P. & Rudd, K. E. YhiQ is RsmJ, the methyltransferase responsible for methylation of G1516 in 16S rRNA of *E. coli*. *J Mol Biol* **415**, 16-21 (2012).
- 86 Helser, T. L., Davies, J. E. & Dahlberg, J. E. Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. *Nat New Biol* **235**, 6-9 (1972).
- 87 Gustafsson, C. & Persson, B. C. Identification of the *rrmA* gene encoding the 23S rRNA m<sup>1</sup>G745 methyltransferase in *Escherichia coli* and characterization of an m<sup>1</sup>G745-deficient mutant. *J Bacteriol* **180**, 359-365 (1998).
- 88 Wrzesinski, J., Nurse, K., Bakin, A., Lane, B. G. & Ofengand, J. A dual-specificity pseudouridine synthase: an *Escherichia coli* synthase purified and cloned on the basis of its specificity for psi 746 in 23S RNA is also specific for psi 32 in tRNA(phe). *Rna* **1**, 437-448 (1995).
- 89 Madsen, C. T., Mengel-Jorgensen, J., Kirpekar, F. & Douthwaite, S. Identifying the methyltransferases for m<sup>5</sup>U747 and m<sup>5</sup>U1939 in 23S rRNA using MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* **31**, 4738-4746 (2003).
- 90 Conrad, J., Sun, D., Englund, N. & Ofengand, J. The *rluC* gene of *Escherichia coli* codes for a pseudouridine synthase that is solely responsible for synthesis of pseudouridine at positions 955, 2504, and 2580 in 23S ribosomal RNA. *J Biol Chem* **273**, 18562-18566 (1998).
- 91 Huang, L. *et al.* Identification of two *Escherichia coli* pseudouridine synthases that show multisite specificity for 23S RNA. *Biochemistry* **37**, 15951-15957 (1998).
- 92 Sergiev, P. V., Serebryakova, M. V., Bogdanov, A. A. & Dontsova, O. A. The ybiN gene of *Escherichia coli* encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A1618 of 23 S ribosomal RNA, a methylated residue located close to the ribosomal exit tunnel. *J Mol Biol* **375**, 291-300, (2008).
- 93 Sergiev, P. V., Lesnyak, D. V., Bogdanov, A. A. & Dontsova, O. A. Identification of *Escherichia coli* m<sup>2</sup>G methyltransferases: II. The *ygjO* gene encodes a methyltransferase specific for G1835 of the 23 S rRNA. *J Mol Biol* **364**, 26-31 (2006).
- 94 Raychaudhuri, S., Conrad, J., Hall, B. G. & Ofengand, J. A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of *Escherichia coli*. *RNA* **4**, 1407-1417 (1998).
- 95 Purta, E., Kaminska, K. H., Kasprzak, J. M., Bujnicki, J. M. & Douthwaite, S. YbeA is the m<sup>3</sup>Ψ methyltransferase RlmH that targets nucleotide 1915 in 23S rRNA. *RNA* **14**, 2234-2244 (2008).
- 96 Ero, R., Peil, L., Liiv, A. & Remme, J. Identification of pseudouridine methyltransferase in *Escherichia coli*. in *RNA* **14**, 2223-2233 (2008).
- 97 Agarwalla, S., Kealey, J. T., Santi, D. V. & Stroud, R. M. Characterization of the 23S ribosomal RNA m<sup>5</sup>U1939 methyltransferase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**, 8835-8840 (2002).
- 98 Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J. M. & Douthwaite, S. YccW is the m<sup>5</sup>C methyltransferase specific for 23S rRNA nucleotide 1962. *J Mol Biol* **383**, 641-651(2008).
- 99 Golovina, A. Y. *et al.* The last rRNA methyltransferase of *E. coli* revealed: the *yhiR* gene encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A2030 of 23S ribosomal RNA. *RNA* **18**, 1725-1734 (2012).
- 100 Kimura, S., Ikeuchi, Y., Kitahara, K., Sakaguchi, Y. & Suzuki, T. Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity. *Nucleic Acids Res* **40**, 4071-4085 (2012).
- 101 Lovgren, J. M. & Wikstrom, P. M. The *rlmB* gene is essential for formation of Gm2251 in 23S rRNA but not for ribosome maturation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 6957-6960 (2001).

- 102 Lesnyak, D. V., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A. & Dontsova, O. A. Identification of *Escherichia coli* m<sup>2</sup>G methyltransferases: I. the *ycbY* gene encodes a methyltransferase specific for G2445 of the 23 S rRNA. *J Mol Biol* **364**, 20-25 (2006).
- 103 Del Campo, M., Kaya, Y. & Ofengand, J. Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *Rna* **7**, 1603-1615 (2001).
- 104 Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J. M. & Douthwaite, S. YgdE is the 2'-O-ribose methyltransferase RlmM specific for nucleotide C2498 in bacterial 23S rRNA. *Mol Microbiol* **72**, 1147-1158 (2009).
- 105 Toh, S. M., Xiong, L., Bae, T. & Mankin, A. S. The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA. *Rna* **14**, 98-106 (2008).
- 106 Caldas, T. *et al.* The FtsJ/RrmJ heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23S ribosomal RNA methyltransferase. *J Biol Chem* **275**, 16414-16419 (2000).
- 107 Bugl, H. *et al.* RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell* **6**, 349-360 (2000).
- 108 Bryskier, A. Antimicrobial agents: antibacterial and antifungals. (2005).
- 109 Vining, L. C. Functions of secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* **44**, 395-427 (1990).
- 110 Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 226-236 (1929).
- 111 Cundliffe, E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* **43**, 207-233 (1989).
- 112 Romero, D., Traxler, M. F., López, D. & Kolter, R. Antibiotics as signal molecules. *Chem Rev* **111**, 5492-5505 (2011).
- 113 Davies, J. What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. *Mol Microbiol* **4**, 1227-1232 (1990).
- 114 Waksman, S. A., & Lechevalier, H. A. Bacteriostatic and bactericidal substances produced by soil Actinomycetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **45**, 609-614 (1949).
- 115 Schatz, A., Bugie, E. & Waksman, S. A. Vol. 55 (ed experimental biology and medicine) 66-69 (1944).
- 116 Umezawa, H. *et al.* Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J Antibiot (Tokyo)* **10**, 181-188 (1957).
- 117 Weinstein, M. J. *et al.* Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora*. *J Med Chem* **6**, 463-464 (1963).
- 118 Umezawa, H., Okanishi, M., Utahara, R., Maeda, K. & Kondo, S. Isolation and structure of kanamycin inactivated by a cell free system of kanamycin-resistant *E. coli*. *J Antibiot (Tokyo)* **20**, 136-141 (1967).
- 119 Umezawa, H. *et al.* Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. *Science* **157**, 1559-1561 (1967).
- 120 Jana, S. & Deb, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**, 140-150 (2006).
- 121 Zhanel, G. G. *et al.* Comparison of the next-generation aminoglycoside plazomicin to gentamicin, tobramycin and amikacin. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**, 459-473 (2012).
- 122 Veyssier, P. & Bryskier, A. in *Antimicrobial agents* 453-469 (ASM Press, 2005).
- 123 Park, S. R., Park, J. W., Ban, Y. H., Sohng, J. K. & Yoon, Y. J. 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways. *Nat Prod Rep* **30**, 11-20 (2013).
- 124 Vicens, Q. & Westhof, E. Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J Mol Biol* **326**, 1175-1188 (2003).
- 125 Holzgrabe, U., Nap, C. J., Kunz, N. & Almeling, S. Identification and control of impurities in streptomycin sulfate by high-performance liquid chromatography coupled with mass detection and corona charged-aerosol detection. *J Pharm Biomed Anal* **56**, 271-279 (2011).
- 126 Freeman, C. D., Nicolau, D. P., Belliveau, P. P. & Nightingale, C. H. Once-daily dosing of aminoglycosides: review and recommendations for clinical practice. *J Antimicrob Chemother* **39**, 677-686 (1997).
- 127 Vakulenko, S. B. & Mobashery, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* **16**, 430-450 (2003).
- 128 Yao, J. & Moellering, R. in *Manual of Clinical Microbiology* (eds P. Murray *et al.*) 1077-1113 (American Society for Microbiology, 2007).
- 129 Ogle, J. M. & Ramakrishnan, V. Structural insights into translational

- fidelity. *Annu Rev Biochem* **74**, 129-177 (2005).
- 130 Davies, J. & Davis, B. D. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *J Biol Chem* **243**, 3312-3316 (1968).
- 131 Moazed, D. & Noller, H. F. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* **327**, 389-394 (1987).
- 132 Purohit, P. & Stern, S. Interactions of a small RNA with antibiotic and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature* **370**, 659-662 (1994).
- 133 Bottger, E. C., Springer, B., Prammananan, T., Kidan, Y. & Sander, P. Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. *EMBO Rep* **2**, 318-323 (2001).
- 134 Recht, M. I., Douthwaite, S. & Puglisi, J. D. Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *Embo j* **18**, 3133-3138 (1999).
- 135 Feldman, M. B., Terry, D. S., Altman, R. B. & Blanchard, S. C. Aminoglycoside activity observed on single pre-translocation ribosome complexes. *Nat Chem Biol* **6**, 54-62 (2010).
- 136 Garrett, R. A., Stephen, R. D., Liljas, A., Matheson, A. T., Moore, P.B. & Noller, H.F. The ribosome : structure, function, antibiotics, and cellular interactions. (ASM Press, 2000).
- 137 Edelman, P. & Gallant, J. Mistranslation in *E. coli*. *Cell* **10**, 131-137 (1977).
- 138 Karimi, R. & Ehrenberg, M. Dissociation rate of cognate peptidyl-tRNA from the A-site of hyper-accurate and error-prone ribosomes. *Eur J Biochem* **226**, 355-360 (1994).
- 139 Tsai, A. *et al.* The impact of aminoglycosides on the dynamics of translation elongation. *Cell Rep* **3**, 497-508 (2013).
- 140 Fourmy, D., Yoshizawa, S. & Puglisi, J. D. Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16 S rRNA. *J Mol Biol* **277**, 333-345 (1998).
- 141 Borovinskaya, M. A. *et al.* Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 727-732 (2007).
- 142 Wang, L. *et al.* Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 957-963 (2012).
- 143 O'Connor, M. & Gregory, S. T. Inactivation of the RluD pseudouridine synthase has minimal effects on growth and ribosome function in wild-type *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **193**, 154-162 (2011).
- 144 Scheunemann, A. E., Graham, W. D., Vendeix, F. A. & Agris, P. F. in *Nucleic Acids Res* Vol. 38 3094-3105 (2010).
- 145 Gutell, R. R. Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures. *Nucleic Acids Res* **21**, 3051-3054 (1993).
- 146 Wilhelm, J. M., Pettitt, S. E. & Jessop, J. J. Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: structure--function relationships in the stimulation of misreading with a wheat embryo system. *Biochemistry* **17**, 1143-1149 (1978).
- 147 Gutell, R. R. Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures: 1994. *Nucleic Acids Res* **22**, 3502-3507 (1994).
- 148 Recht, M. I., Fourmy, D., Blanchard, S. C., Dahlquist, K. D. & Puglisi, J. D. RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide. *J Mol Biol* **262**, 421-436 (1996).
- 149 Yoshizawa, S., Fourmy, D. & Puglisi, J. D. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *Embo j* **17**, 6437-6448 (1998).
- 150 Hermann, T. & Westhof, E. Aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme: a general model for the interaction of cationic antibiotics with RNA. *J Mol Biol* **276**, 903-912 (1998).
- 151 Eliopoulos, G. M. Synergism and antagonism. *Infect Dis Clin North Am* **3**, 399-406 (1989).
- 152 Bryan, L. E., Kowand, S. K. & Van Den Elzen, H. M. Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **15**, 7-13 (1979).
- 153 World Health Organization. Critically important 1 antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use: report of the second WHO expert meeting, [http://www.who.int/foodborne\\_disease/resistance/antimicrobials\\_human.pdf](http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf). (2007).
- 154 Menzies, D. *et al.* Effect of duration and intermittency of rifampin on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* **6**, e1000146 (2009).

- 155 Brossier, F., Veziris, N., Aubry, A., Jarlier, V. & Sougakoff, W. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* **48**, 1683-1689 (2010).
- 156 Rich, D. P. *et al.* Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* **347**, 358-363 (1990).
- 157 Kellermayer, R. Translational readthrough induction of pathogenic nonsense mutations. *Eur J Med Genet* **49**, 445-450 (2006).
- 158 Dabertrand, F., Mironneau, J., Henaff, M., Macrez, N. & Morel, J. L. Comparison between gentamycin and exon skipping treatments to restore ryanodine receptor subtype 2 functions in mdx mouse duodenum myocytes. *Eur J Pharmacol* **628**, 36-41 (2010).
- 159 Nakashima, T., Teranishi, M., Hibi, T., Kobayashi, M. & Umemura, M. Vestibular and cochlear toxicity of aminoglycosides--a review. *Acta Otolaryngol* **120**, 904-911 (2000).
- 160 Houghton, J. L., Green, K. D., Chen, W. & Garneau-Tsodikova, S. The future of aminoglycosides: the end or renaissance? *Chembiochem* **11**, 880-902 (2010).
- 161 Goodman, L. S. & Gilman, A. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (1985).
- 162 Barclay, M. L. *et al.* Adaptive resistance to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* **37**, 1155-1164 (1996).
- 163 Mukhopadhyay, S. *et al.* The quantitative distribution of nebulized antibiotic in the lung in cystic fibrosis. *Respir Med* **88**, 203-211 (1994).
- 164 Hoffman, L. R. *et al.* Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**, 1171-1175 (2005).
- 165 Ramsey, B. W. *et al.* Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. *N Engl J Med* **340**, 23-30 (1999).
- 166 Folkesson, A. *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **10**, 841-851 (2012).
- 170 Smith, E. E. *et al.* Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8487-8492 (2006).
- 168 Cystic Fibrosis Foundation patient registry 2010 annual data report. (Cystic Fibrosis Foundation, 2011).
- 169 Geller, D. E., Pitlick, W. H., Nardella, P. A., Tracewell, W. G. & Ramsey, B. W. Pharmacokinetics and bioavailability of aerosolized tobramycin in cystic fibrosis. *Chest* **122**, 219-226 (2002).
- 170 Gibson, R. L. *et al.* Significant microbiological effect of inhaled tobramycin in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 841-849 (2003).
- 171 Munck, A. *et al.* Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization. *Pediatr Pulmonol* **32**, 288-292 (2001).
- 172 Jelsbak, L. *et al.* Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* **75**, 2214-2224 (2007).
- 173 Matt, T. *et al.* Dissociation of antibacterial activity and aminoglycoside ototoxicity in the 4-monosubstituted 2-deoxystreptamine apramycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 10984-10989 (2012).
- 174 Prescott, J. F. Antimicrobial use in food and companion animals. *Anim Health Res Rev* **9**, 127-133 (2008).
- 175 Kondo, S. & Hotta, K. Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: Development and enzymatic modifications. *J Infect Chemother* **5**, 1-9 (1999).
- 176 Yoshii, A., Moriyama, H. & Fukuhara, T. The novel kasugamycin 2'-N-acetyltransferase gene *aac(2')-IIa*, carried by the IncP island, confers kasugamycin resistance to rice-pathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **78**, 5555-5564 (2012).
- 177 Chamber, H. F. & Sande, M. A. *The aminoglycosides*. 9th edn, 1103-1221 (McGraw-Hill, 1996).
- 178 Edson, R. S. & Terrell, C. L. The aminoglycosides. *Mayo Clin Proc* **66**, 1158-1164 (1991).
- 179 Henley, C. M. & Schacht, J. Pharmacokinetics of aminoglycoside antibiotics in blood, inner-ear fluids and tissues and their relationship to ototoxicity. *Audiology* **27**, 137-146 (1988).

- 180 Fischel-Ghodsian, N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Pharmacogenomics* **6**, 27-36 (2005).
- 181 Oliveira, J. F. *et al.* Prevalence and risk factors for aminoglycoside nephrotoxicity in intensive care units. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2887-2891 (2009).
- 182 Martínez-Salgado, C., López-Hernández, F. J. & López-Novoa, J. M. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol Appl Pharmacol* **223**, 86-98 (2007).
- 183 Guthrie, O. W. Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology* **249**, 91-96 (2008).
- 184 Mingeot-Leclercq, M. P. & Tulkens, P. M. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1003-1012 (1999).
- 185 Guan, M. X. Mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity. *Mitochondrion* **11**, 237-245 (2011).
- 186 Hutchin, T. *et al.* A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* **21**, 4174-4179 (1993).
- 187 Ruiz-Pesini, E. & Wallace, D. C. Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA. *Hum Mutat* **27**, 1072-1081 (2006).
- 188 Hobbie, S. N. *et al.* Genetic analysis of interactions with eukaryotic rRNA identify the mitoribosome as target in aminoglycoside ototoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20888-20893 (2008).
- 189 Zorov, D. B. Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity requires protection of renal mitochondria. *Kidney Int* **77**, 841-843 (2010).
- 190 Ofengand, J. & Del Campo, M. (ed R Curtiss) Modified nucleosides in *Escherichia coli* ribosomal RNA. In *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* Ch. 4.6.1. (ASM, 2004).
- 191 Decatur, W. A. & Fournier, M. J. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* **27**, 344-351 (2002).
- 192 Hallberg, B. M. *et al.* The structure of the RNA m<sup>5</sup>C methyltransferase YebU from *Escherichia coli* reveals a C-terminal RNA-recruiting PUA domain. *J Mol Biol* **360**, 774-787 (2006).
- 193 Zhang, H. *et al.* Insights into the Catalytic Mechanism of 16S rRNA Methyltransferase RsmE (m(3)U1498) from Crystal and Solution Structures. *J Mol Biol* **423**, 576-589 (2012).
- 194 Boehringer, D., O'Farrell, H. C., Rife, J. P. & Ban, N. Structural insights into methyltransferase KsgA function in 30S ribosomal subunit biogenesis. *J Biol Chem* **287**, 10453-10459 (2012).
- 195 Keiler, K. C. Biology of trans-translation. *Annu Rev Microbiol* **62**, 133-151 (2008).
- 196 Lee, T. T., Agarwalla, S. & Stroud, R. M. A unique RNA Fold in the RumA-RNA-cofactor ternary complex contributes to substrate selectivity and enzymatic function. *Cell* **120**, 599-611 (2005).
- 197 Galimand, M. *et al.* Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m<sup>5</sup>C1404-specific methyltransferase EfmM *RNA* **17**, 251-262 (2011).
- 198 Wachino, J. & Arakawa, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat* **15**, 133-148 (2012).
- 199 Hidalgo, L. *et al.* Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother* **68**, 1543-1550 (2013).
- 200 Bueno, M. F., Francisco, G. R., O'Hara, J. A., de Oliveira Garcia, D. & Doi, Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 2397-2400 (2013).
- 201 O'Hara, J. A. *et al.* Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 2413-2416 (2013).
- 202 Tenover, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* **34**, S3-10; discussion S64-73 (2006).
- 203 Huttner, B., Goossens, H., Verheij, T., Harbarth, S. & consortium, C. Characteristics and outcomes of public campaigns aimed at improving the use of antibiotics in outpatients in high-income countries. *Lancet Infect Dis* **10**, 17-31 (2010).
- 204 Wang, X. & Quinn, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res* **49** (2010).
- 205 McCollister, B. D., Hoffman, M., Husain, M. & Vázquez-Torres, A. Nitric oxide protects bacteria from aminoglycosides by

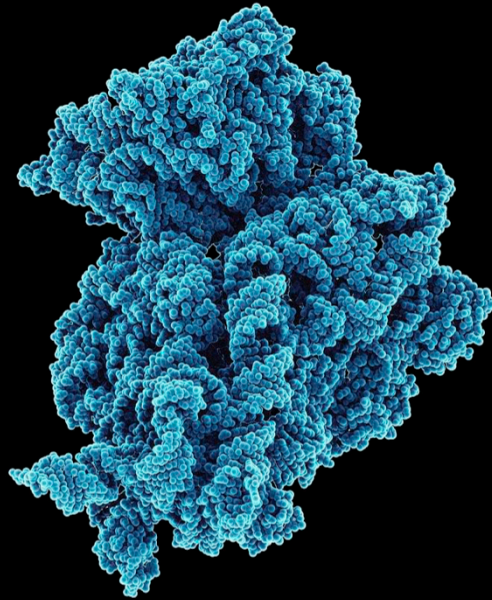


- blocking the energy-dependent phases of drug uptake. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2189-2196 (2011).
- 206 Gusarov, I., Shatalin, K., Starodubtseva, M. & Nudler, E. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* **325**, 1380-1384 (2009).
  - 207 Poole, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* **39**, 162-176 (2007).
  - 208 Li, X. Z. & Nikaido, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* **69**, 1555-1623 (2009).
  - 209 Su, X. Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T. & Tsuchiya, T. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4362-4364 (2005).
  - 210 Begum, A. *et al.* Gene cloning and characterization of four MATE family multidrug efflux pumps from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiol Immunol* **49**, 949-957 (2005).
  - 211 De Rossi, E. *et al.* The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med* **8**, 714-724 (2002).
  - 212 Poole, K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 479-487 (2005).
  - 213 Duguay, A. R. & Silhavy, T. J. Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 121-134 (2004).
  - 214 Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G. & Collins, J. J. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* **135**, 679-690 (2008).
  - 215 Hinz, A., Lee, S., Jacoby, K. & Manoil, C. Membrane proteases and aminoglycoside antibiotic resistance. *J Bacteriol* **193**, 4790-4797 (2011).
  - 216 Tolmasky, M. Overview of dissemination mechanisms of genes coding for resistance to antibiotics. 267-270 (ASM Press, 2007).
  - 217 Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S. & Miller, G. H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* **57**, 138-163 (1993).
  - 218 Oteo, J. *et al.* Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol* **44**, 2359-2366 (2006).
  - 219 Novick, R. P. *et al.* Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev* **40**, 168-189 (1976).
  - 220 Tolmasky, M. in Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition (eds RA. Bonomo & ME Tolmasky) 35-52 (ASM Press, 2007).
  - 221 Vanhoof, R., Hannecart-Pokorni, E. & Content, J. Nomenclature of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 483 (1998).
  - 222 Vetting, M. W. *et al.* Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **433**, 212-226 (2005).
  - 223 Azucena, E. & Mobashery, S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resist Updat* **4**, 106-117 (2001).
  - 224 Wright, G. & Berghuis, A. in Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition (eds RA. Bonomo & ME. Tolmasky) 21-33 (ASM Press, 2007).
  - 225 Wright, G. D. & Thompson, P. R. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* **4**, D9-21 (1999).
  - 226 Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y. & Tulkens, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 727-737 (1999).
  - 227 O'Connor, M., De Stasio, E. A. & Dahlberg, A. E. Interaction between 16S ribosomal RNA and ribosomal protein S12: differential effects of paromomycin and streptomycin. *Biochimie* **73**, 1493-1500 (1991).
  - 228 De Stasio, E. A., Moazed, D., Noller, H. F. & Dahlberg, A. E. Mutations in 16S ribosomal RNA disrupt antibiotic-RNA interactions. *EMBO J* **8**, 1213-1216 (1989).
  - 229 Basso, L. A., Blanchard, J. S. Resistance to antitubercular drugs, in Resolving the Antibiotic Paradox - Progress in Understanding Drug Resistance and Development of New Antibiotics. 115-144 (1998).
  - 230 Springer, B. *et al.* Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2877-2884 (2001).

- 231 Hotta, K. & Okaki, Y. Diversity in aminoglycoside antibiotic resistance of actinomycetes and its exploitation in the search for novel antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* **17**, 352-358 (1996).
- 232 Suzuki K, N. K., Shimizu Y & Suzuki Y. Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica* **8**, 122-127 (1994).
- 233 Beauclerk, A. A. & Cundliffe, E. Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J Mol Biol* **193**, 661-671 (1987).
- 234 Skeggs, P. A., Holmes, D. J. & Cundliffe, E. Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other actinomycetes. *J Gen Microbiol* **133**, 915-923 (1987).
- 235 Cundliffe, E. Resistance to macrolides and lincosamides in *Streptomyces lividans* and to aminoglycosides in *Micromonospora purpurea*. *Gene* **115**, 75-84 (1992).
- 236 Demydchuk, J., Oliynyk, Z. & Fedorenko, V. Analysis of a kanamycin resistance gene (*kmr*) from *Streptomyces kanamyceticus* and a mutant with increased aminoglycoside resistance. *J Basic Microbiol* **38**, 231-239 (1998).
- 237 Holmes, D. J., Drocourt, D., Tiraby, G. & Cundliffe, E. Cloning of an aminoglycoside-resistance-encoding gene, *kamC*, from *Saccharopolyspora hirsuta*: comparison with *kamB* from *Streptomyces tenebrarius*. *Gene* **102**, 19-26 (1991).
- 238 Savic, M., Lovric, J., Tomic, T. I., Vasiljevic, B. & Conn, G. L. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* **37**, 5420-5431 (2009).
- 239 Zelinskaya, N., Rankin, C. R., Macmaster, R., Savic, M. & Conn, G. L. Expression, purification and crystallization of adenosine 1408 aminoglycoside-resistance rRNA methyltransferases for structural studies. *Protein Expr Purif* **75**, 89-94 (2011).
- 240 Wachino, J. *et al.* Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA m<sup>1</sup>A1408 Methyltransferase, NpmA, Found in a Clinically Isolated *Escherichia coli* Strain Resistant to Structurally Diverse Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 4401-4409 (2007).
- 241 Liou, G. F., Yoshizawa, S., Courvalin, P. & Galimand, M. Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *J Mol Biol* **359**, 358-364 (2006).
- 242 Wachino, J. *et al.* RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* **311**, 56-60 (2010).
- 243 Périchon, B., Courvalin, P. & Galimand, M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2464-2469 (2007).
- 244 Schmitt, E., Galimand, M., Panvert, M., Courvalin, P. & Mechulam, Y. Structural bases for 16 S rRNA methylation catalyzed by ArmA and RmtB methyltransferases. *J Mol Biol* **388**, 570-582 (2009).
- 245 Husain, N. *et al.* Structural basis for the methylation of G1405 in 16S rRNA by aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm from an antibiotic producer: a diversity of active sites in m<sup>7</sup>G methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **38**, 4120-4132 (2010).
- 246 Macmaster, R., Zelinskaya, N., Savic, M., Rankin, C. R. & Conn, G. L. Structural insights into the function of aminoglycoside-resistance A1408 16S rRNA methyltransferases from antibiotic-producing and human pathogenic bacteria. *Nucleic Acids Res* **38**, 7791-7799 (2010).
- 247 Martin, J. L. & McMillan, F. M. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 783-793 (2002).
- 248 Maravić Vlahovicek, G., Cubrilo, S., Tkaczuk, K. L. & Bujnicki, J. M. Modeling and experimental analyses reveal a two-domain structure and amino acids important for the activity of aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 582-590 (2008).
- 249 Savic, M., Ilic-Tomic, T., Macmaster, R., Vasiljevic, B. & Conn, G. L. Critical residues for cofactor binding and catalytic activity in the aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. *J Bacteriol* **190**, 5855-5861 (2008).
- 250 Zegers, I. *et al.* Crystal structure of *Bacillus subtilis* TrmB, the tRNA

- (m<sup>7</sup>G46) methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **34**, 1925-1934 (2006).
- 251 Romanowski, M. J., Bonanno, J. B. & Burley, S. K. Crystal structure of the *Escherichia coli* glucose-inhibited division protein B (GidB) reveals a methyltransferase fold. *Proteins* **47**, 563-567 (2002).
  - 252 White, J. *et al.* Bud23 methylates G1575 of 16S rRNA and is required for efficient nuclear export of pre-40S subunits. *Mol Cell Biol* **28**, 3151-3161 (2008).
  - 253 Fabrega, C., Hausmann, S., Shen, V., Shuman, S. & Lima, C. D. Structure and mechanism of mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase. *Mol Cell* **13**, 77-89 (2004).
  - 254 Yokoyama, K. *et al.* Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* **362**, 1888-1893 (2003).
  - 255 Galimand, M., Courvalin, P. & Lambert, T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2565-2571 (2003).
  - 256 Doi, Y. *et al.* Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 491-496 (2004).
  - 257 Wachino, J. *et al.* Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 178-184 (2006).
  - 258 Doi, Y., de Oliveira Garcia, D., Adams, J. & Paterson, D. L. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 852-856 (2007).
  - 259 Tijet, N. *et al.* *rmtD2*, a new allele of a 16S rRNA methylase gene, has been present in Enterobacteriaceae isolates from Argentina for more than a decade. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 904-909 (2011).
  - 260 Davis, M. A. *et al.* Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 2666-2669 (2010).
  - 261 Castanheira, M., Fritsche, T. R., Sader, H. S. & Jones, R. N. RmtD 16S RNA methylase in epidemiologically unrelated *spm-1*-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1587-1588 (2008).
  - 262 Doi, Y., Ghilardi, A. C., Adams, J., de Oliveira Garcia, D. & Paterson, D. L. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3388-3390 (2007).
  - 263 Fontes, L. C. *et al.* Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo-β-lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3063-3064 (2011).
  - 264 Hopkins, K. L., Escudero, J. A., Hidalgo, L. & Gonzalez-Zorn, B. 16S rRNA methyltransferase RmtC in *Salmonella enterica* serovar Virchow. *Emerg Infect Dis* **16**, 712-715 (2010).
  - 265 Ma, L. *et al.* Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 104-111 (2009).
  - 266 Mushtaq, S. *et al.* Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* **66**, 2002-2005 (2011).
  - 267 Livermore, D. M. *et al.* Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother* **66**, 48-53 (2011).
  - 268 Poirer, L., Bonnin, R. A. & Nordmann, P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 4224-4229 (2011).
  - 269 Ho, P. L. *et al.* Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PLoS One* **6**, e17989 (2011).
  - 270 Sekizuka, T. *et al.* Complete sequencing of the *bla*(NDM-1)-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One* **6**, e25334 (2011).
  - 271 Ruiz, J., Pons, M. J. & Gomes, C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents* **40**, 196-203 (2012).
  - 272 Jiang, Y. *et al.* Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae*

- multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *blaKPC-2*, *blaDHA-1*, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3967-3969 (2010).
- 273 Liu, J. H. *et al.* Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6)-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2992-2993 (2008).
- 274 Deng, Y. *et al.* Dissemination of IncFII plasmids carrying *rmtB* and *qepA* in *Escherichia coli* from pigs, farm workers and the environment. *Clin Microbiol Infect* **17**, 1740-1745 (2011).
- 275 Deng, Y. *et al.* F33:A-B- and F2:A-B- plasmids mediate dissemination of *rmtB*-*blaCTX-M-9* group genes and *rmtB-qepA* in *Enterobacteriaceae* isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 4926-4929 (2011).
- 276 Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S. & Arakawa, Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1564-1566 (2008).
- 277 Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964 (2000).
- 278 Poldermans, B., Roza, L. & Van Knippenberg, P. H. Studies on the function of two adjacent N6,N6-dimethyladenosines near the 3' end of 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. III. Purification and properties of the methylating enzyme and methylase-30 S interactions. *J Biol Chem* **254**, 9094-9100 (1979).
- 279 Cubrilo, S., Babic, F., Douthwaite, S. & Maravic Vlahovicek, G. The aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm impedes RsmF methylation at an adjacent rRNA nucleotide in the ribosomal-A site. *RNA* **15**, 1492-1497 (2009).
- 280 Liroy, V. S. *et al.* Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. *RNA* (2014).
- 281 Chen, Y. T. *et al.* Mobilization of *qnrB2* and ISCR1 in plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1235-1237 (2009).
- 282 Poiriel, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Mammeri, H., Liard, A. & Nordmann, P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3523-3525 (2005).
- 283 Turiel, E., Martín-Esteban, A., Bordin, G. & Rodríguez, A. R. Stability of fluoroquinolone antibiotics in river water samples and in octadecyl silica solid-phase extraction cartridges. *Anal Bioanal Chem* **380**, 123-128 (2004).
- 284 Hidalgo, L. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* ST11 from companion animals bearing ArmA methyltransferase, DHA-1  $\beta$ -lactamase and QnrB4. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 4532-4534 (2013).
- 285 Granier, S.A., Hidalgo, L., San Millan, A., Escudero, J.A., Gutierrez, B., Bris-abois, A. & Gonzalez-Zorn, B. ArmA methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 5262-5266 (2011).



El ribosoma es la enzima más antigua que existe en la naturaleza y cumple la misma función en todas las células vivas: la síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano es la diana de múltiples antibióticos que van a interactuar con componentes cruciales del mismo, teniendo un efecto letal en la bacteria. La metilación específica del ARNr 16S ha emergido recientemente como mecanismo de resistencia a aminoglucósidos en patógenos Gram-negativos, expandiéndose rápidamente a nivel mundial y agotando las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por dichos patógenos.

A lo largo de esta tesis doctoral se ha estudiado el mecanismo de acción, el coste biológico y las interferencias con metilaciones fisiológicas derivadas de la adquisición de este mecanismo de resistencia emergente. A pesar de que dichas metiltransferasas de resistencia modifican el patrón de metilación del ribosoma, conservado a lo largo de la evolución, éstas parecen no encontrar impedimentos a la hora de entrar a formar parte del tetrís evolutivo de metilaciones del ribosoma, desplazando incluso a las metilaciones intrínsecas de la bacteria.